

**Zur Frage der Beteiligung
des Kininogen — Kininsystems und von
Histamin am Verbrühungsschock der Ratte**

Zbigniew Lewandowski

1976

Aus dem Institut für Biochemie und Klinische Chemie an der
Chirurgischen Klinik der Universität München

Direktor: Professor Dr.Dr. E. Werle

Zur Frage der Beteiligung des Kininogen - Kininsystems und
von Histamin am Verbrühungsschock der Ratte.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Zbigniew Lewandowski
München

1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Naumann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Buchborn, Prof. Dr. Klingenberg

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Januar 1976

Herrn Prof.Dr.Dr.E.Werle möchte ich für die Überlassung des
Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes meinen
herzlichsten Dank aussprechen.

Herrn Dr. Gerhard Engler danke ich herzlich für die freund-
liche Unterstützung und die jederzeit bereitwillig gewährten
Ratschläge.



	Seite
A. <u>Vorkommen und Bedeutung der Kinine, biogener Amine und Proteinaseinhibitoren</u>	1
I. <u>Geschichte der Entdeckung und Isolierung</u>	1
Beobachtungen Abelous und Bardiers 1909	1
Entdeckungen von Frey, Kraut und Werle 1927	1
Entdeckung Rocha e Silva	1
II. <u>Physiologie des Kininsystems</u>	2
1) Vorkommen und Aktivierung	2
2) Pharmakologische Eigenschaften	2
3) Die Inhibitoren des Kininsystems	3
4) Einige physiologische Wirkungen der Kinine	4
III. <u>Die Verbrennungskrankheit</u>	4
1) Fortschritte und Mängel in der Therapie	4
2) Morphologische Untersuchungen	5
3) Das Verbrennungsödem und der Schock	6
4) Der Stoffwechsel im Schock	7
5) Das Gerinnungssystem und der Schock	7
IV. <u>Vom lokalen Geschehen zum generalisierten Verbrennungssyndrom</u>	9
1) Die Theorie der Schockmediatoren	9
2) Bisher nachgewiesenes Auftreten von Kininen	9
V. <u>Pathophysiologie der Proteolyse bei Verbrennungen</u>	10
1) Der Zelluntergang	10
2) Die Rolle der Lysosomenproteinase	10
3) Die Beziehungen zwischen freigesetzten Proteinase und dem Kininsystem	11
4) Schockdiagramm	11
B. <u>Die Versuchsanordnung</u>	12
I. <u>Das Verbrühungsschockmodell</u>	12
1) Verschiedene Schockmodelle	12

2) Vorteile der Verbrühung	13
3) Das Versuchstier	13
4) Technik und Versuchsbedingungen	14
5) Diskussion zum Versuch	16
 C. Experimentelle Untersuchungen	 17
1) Carboxypeptidase B und Sojabohneninhibitor	17
Diagramm Carb.B	22
Diagramm SBTI	23
Kombinationsversuch: Carb.B + SBTI	24
2) Die Rolle des Histamins: Antistin	26
Diagramm Antistin	28
Diagramm 5-OH-Tryptophan	29
3) Die Rolle des Gerinnungssystems	31
Diagramm Hexadimethrinbromid	33
4) Das Na- Thioglykolat	34
5) Der Proteinaseinhibitor Trasylol	37
Diagramme Trasylol	41
Diagramm d. Kombinationsversuchs Trasylol+SBTI	46
Kombinationsversuch Trasylol + Antistin	47
 D. Zusammenfassung und abschließende Diskussion	 48
Diagramme	52
Mortalitätsstatistik	54
 Literaturverzeichnis	 55

A. Vorkommen und Bedeutung der Kinine, biogener Amine und
Proteinaseninhibitoren.

I) Geschichte der Entdeckung und Isolierung.

Bereits 1909 entdeckten A b e l o u s und B a r d i e r im Harn eine Substanz mit blutdrucksenkender Wirkung, welche sie U r o h y p o t e n s i n nannten. E. K. F r e y stellte 1925 fest, daß nach intravenöser Harninjektion der mittlere Blutdruck eines Hundes regelmäßig sank (5). Zusammen mit H. K r a u t konnte er nachweisen, daß diese blutdrucksenkende Substanz, die später den Namen K a l l i k r e i n erhielt durch Kontakt mit Plasma inaktiviert wird.

1936 fand W e r l e , daß durch Einwirkung von Kallikrein auf Serum eine Substanz entsteht, deren Darmkontraktionsaktivität um ein Vielfaches größer war als die des Kallikreins (1). Diese zweite, auch kreislaufwirksame Substanz erhielt den Namen K a l l i d i n, das Kallikreinsubstrat wurde entsprechend als K a l l i d i n o g e n bezeichnet. Das Kallidin ist die eigentliche pharmakologisch wirksame Substanz und besitzt alle pharmakologischen Aktivitäten die dem Kallikrein zugeschrieben worden waren.

Durch Behandlung von Serum mit Schlangengift oder Trypsin gewann im Jahre 1949 R o c h a e S i l v a eine weitere blutdrucksenkende Substanz : B r a d y k i n i n (2).

Nachdem 1950 von W e r l e erkannt wurde, daß Kallidin und Bradykinin aus demselben Substrat im Plasma stammen erfolgte in den Jahren 1960 - 1962 die Isolierung, Sequenzanalyse und Synthese beider Substanzen (3,4).

Heute bezeichnet man diese aus dem Blutplasma freisetzbaren, hypotensiven und darmkontrahierenden Substanzen allgemein als K i n i n e und ihre entsprechenden inaktiven Vorstufen K i n i n o g e n e und die Enzyme, die aus Kininogen Kinin freisetzen K i n i n o g e n a s e n.

1929 entdeckte E. W e r l e im Laboratorium von H. K r a u t einen Inaktivator für Kallikrein in Lymphknoten und in Ohrspeicheldrüsen von Rindern. Später in vielen weiteren Organen von Rindern wie Leber und Lunge. Dieser sog. Drüsen-Inaktivator, er erhielt später den Namen Trasylol, ist im Gegensatz zum "Seruminaktivator" niedermolekularer und erwies sich als identisch mit dem von Kunitz 1935 im Pankreas von Rindern nachgewiesenem basischen Trypsininhibitor. Nachdem W e r l e u. Mitarbeiter festgestellt hatten, daß der sog. Drüseninaktivator auch in Rinderpankreas vorkommt wurde die Identität des Kunitz- und des sog. Drüseninaktivators erkannt.

Der Drüseninaktivator als therapeutisches Prinzip wurde durch Frey u. Mitarbeiter 1953 in die Klinik eingeführt.

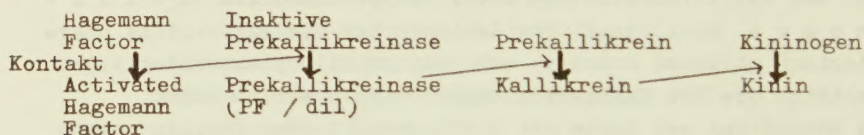
Beim Kallikrein handelt es sich um eine Proteinase, die nicht direkt sondern indirekt durch die Freisetzung von Mediatoren in die physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen des Körpers eingreift. Das Verdienst das Mediatorenprinzip als erster erkannt zu haben, kommt Werle zu.

II.) Physiologie des Kininsystems.

1.) Vorkommen und Aktivierung

Bei den Säugetieren und beim Menschen kommt das Enzym als Vorstufe (Präkallikrein) und in freier Form (Kallikrein) in Plasma, Darm, Pankreas, Mundspeicheldrüsen und im Harn vor. Im Plasma kommt das Enzym nur in Form des Präkallikreins vor (6).

Die Aktivierung des Kallikreins erfolgt entweder über den Zusatz von proteolytischen Enzymen wie Trypsin, Papain, Plasmin oder über die Liberierung plasmagener proteolytischer Enzyme (7).



Mechanismus der Aktivierung von menschlichem Plasmakallikrein nach Webster (8).

Allen Kallikreinen ist gemeinsam, daß sie Kininogen spalten; sie unterscheiden sich durch den Ort an dem sie ihr Substratmolekül spalten. Kinine sind die durch Kallikrein aus ihrer inaktiven Vorstufe, dem Kininogen freisetzbaren, hypotensiven und darmkontrahierenden Substanzen. Kininogen findet sich hauptsächlich im Blutplasma, im Serum und der interstitiellen Flüssigkeit. Im menschlichen Serum ist das Kininogen an die Globulinfraktion gebunden (9).

Zur Zeit wird die Existenz zweier verschiedener Kininogenasen und Kininorstufen diskutiert, wobei die plasminaktivierbare Kininogenase II nur das Kininogen II angreifen soll, nicht jedoch das durch Kallikrein und Trypsin spaltbare Kininogen I (10).

2.) Pharmakologische Wirkungen

Kinine sind Polypeptide, die durch folgende pharmakologische Wirkungen ausgezeichnet sind: Vasodilatation, Kontraktion glatter Muskeln, Steigerung der Kapillarpermeabilität, Bronchokonstriktion und Schmerzherzeugung. Die Kinine gehören zur Gruppe der sog. Gewebshormone.

4.) Einige physiologische Wirkungen der Kinine

L e w i s wies erstmals darauf hin, daß die Kinine alle Zeichen der Entzündung hervorrufen können, also " rubor, dolor, calor und functio laesa " (16).

Von besonderem Interesse ist die Kininwirkung auf das H e r z - und K r e i s l a u f s y s t e m . Kallikreine und Kinine senken den mittleren arteriellen Druck beim Menschen und allen gebräuchlichen Versuchstieren (7). Die dazu benötigte Schwellendosis ist sehr gering (18). Sie steigert die Herzfrequenz und führt zu einer Zunahme des Schlag - und Minutenvolumens des Herzens (7,19). Schon E o c h a e S i l v a wies darauf hin, daß die Kinine eine Gefäßpermeabilitätserhöhende Wirkung haben (20). Durch Verabreichung von Evans Blue konnte der Plasmaaustritt quantitativ erfaßt werden (21,22). Die erhöhte Gefäßpermeabilität ist mit einem Auseinanderweichen der Endothelzellen an den " i n t e r c e l l u l a r j u n c t i o n s " verbunden, so daß Lücken entstehen. Die Basalmembran bleibt intakt (23). Bei intraarterieller Applikation von Kininen kommt es zu einer Dilatatio der Arteriolen und Kapillaren sowie zu einer Öffnung des arteriovenösen S h u n t s (24).

Außer ihrer Wirkung auf das Herz- und Kreislaufsystem erregt die Kinine die glatte Muskulatur von Darm und Uterus zur Kontraktion und lösen L e ü k o z y t e n w a n d e r u n g e n aus (25). Das Kininsystem und seine Wirkungen dürfen nicht isoliert betrachtet werden. Es tritt in mannigfache Beziehungen zu anderen Organsystemen. So konnte beispielsweise L e w i s nachweisen, daß B r a d y k i n i n aus dem Nebennierenmark C a t e c h o l a m i n e freisetzt. (26). Die Catecholaminausscheidung scheint der Gegenregulierung der Kininwirkung zu dienen (27). Nach Heutefach und Werle besteht eine positive Korrelation zwischen Kallikrein- und Metanephrine-Ausscheidung im Harn.

III.) Die Verbrennungskrankheit

1.) Fortschritte und Mängel in der Therapie

Noch zur Zeit des ersten Weltkrieges waren die Überlebenschancen eines Patienten mit Verbrühungen oder Verbrennungen von 50 % der Körperoberfläche sehr gering (45). Erst als man erkannte, daß nicht der örtliche Schaden sondern der durch ihn ausgelöste Schädigungskomplex, die V e r b r e n n u n g s k r a n k h e i t im Vordergrund steht, wurden wesentliche Fortschritte in der Therapie

erzielt. In den Nachkriegsjahren erarbeiteten C o p e, E v a n s, Moore u.a. die Grundlagen der jetzt herrschenden Therapie der Flüssigkeitssubstitution (46). Dank ihrer Erkenntnisse konnten die Überlebenschancen der Patienten jüngerer Alters erheblich gesteigert werden. Nichtsdestoweniger sind die Therapieergebnisse seit dieser Zeit nicht mehr wesentlich verbessert worden.

Die Verbrennungskrankheit wurde bisher in drei Stadien eingeteilt:

- in den Schock mit seinem Volumenverlust
- in die Intoxikation durch Eiweißabbauprodukte
- in die Infektion der Wunde o. die allgemeine Sepsis

Bisher war man überzeugt, daß eine ausgewogene Volumensubstitution, Elektrolytkontrollen und die Verhütung von Infektionen eine optimale Therapie garantieren würden. Hierbei wurde jedoch übersehen, daß nicht jedes Schocksyndrom mit seiner Störung der Mikrozirkulation erkannt wird. Selbst bei einem behandeltem Schock sind die sich entwickelnden multiplen Organschäden kaum zu erfassen. Es ist bezeichnend, daß es in der einschlägigen Literatur keine Langzeitstudie gibt, welche eventuelle Spätschäden bei ehemaligen Verbrennungs- und Verbrühungspatienten erfassen würde. Die klinische Diagnostik ist nicht in der Lage solche sich erst spät manifestierenden Organveränderungen anzuzeigen.

Das vollständige Aufklären der Pathophysiologie der Verbrennungskrankheit und der gezielte Einsatz der Antischocktherapie könnte es uns ermöglichen, solchen Veränderungen vorzubeugen.

2.) Morphologische Untersuchungen

Der Grad der Gewebsschädigung wird nach Allgower durch zwei Faktoren beeinflusst (47) :

- die Temperatur
- die Einwirkungsdauer der Wärmequelle

Der Schweregrad der Verbrennungskrankheit hängt von dem Prozentsatz der Verbrannten Körperoberfläche und dem Verbrennungsgrad, d.h. der Tiefe des verbrannten Gewebes ab. Trotz der lokalen Schädigung hat das Trauma Auswirkungen auf den ganzen Organismus. Deshalb spricht A r t u r s ' o n auch von einem " B u r n S y n d r o m " welches vor allem durch Flüssigkeitsverschiebungen qualitativer und quantitativer Art charakterisiert ist (28).

Das thermische Trauma führt zu einem Gewebeuntergang in seinem unmittelbarem Wirkungsbereich. Auch zunächst reversibel geschädigte Bezirke können im weiteren Verlauf durch mechanische (Ödem) oder zirkulatorische (Mikrozirkulationsstörungen) Einflüsse nekrotisch

krotisch werden. Neben der Koagulationsnekrose der oberen Hautschichten entwickelt sich eine reversible oder auch irreversible Schädigung der darunterliegenden Kapillaren, die sich in einer von der Wärmeintensität abhängigen Permeabilitätsstörung äußert. Plasmaprotein verläßt das Gefäßsystem. Dieser Vorgang ist von deutlichen wasser- und Elektrolytverschiebungen sowohl im extrazellulären als auch intrazellulärem Raum begleitet. Es sammeln sich osmotisch aktive Plasmaproteine gewöhnlich mit Wasser und Salzen im interstitiellen Raum an. Sie bilden das typische Verbrennungsödem.

3.) Das Verbrennungsödem und der Schock

Die aus der Permeabilitätsstörung resultierende Hypovolämie führt zu den Symptomen des Kreislaufschocks. Der Schock wird definiert als ein Zustand beeinträchtigter Kreislaufverhältnisse mit ungenügender Gewebsperfusion und einem Mißverhältnis zwischen dem Stoffwechselbedarf des Gewebes und der am Ort vorhandenen Sauerstoffmenge (29,30). Das morphologische Korrelat des klinischen Begriffs Schock ist der aus Plättchen und Fibrin bestehende Thrombus (48).

Bedingt durch Tonusveränderungen in den Gefäßwänden und/oder einem intravasalen Volumenabfall beobachtet man in der Frühphase des Schocks ein Absinken besonders des arteriellen Blutdrucks. Grundsätzlich führt ein Absinken des mittleren Drucks in den großen thorakalen Gefäßen über eine Verminderung der Aktivität im Carotis-Aorta-Hypothalamus-Barorezeptorsystem zu einer Tonussteigerung des sympathischen Nervensystems. Dieses wiederum induziert vermehrte Ausschüttung von Katecholaminen, die über eine Konstriktion der präkapillären arteriolen und der postkapillären venolären

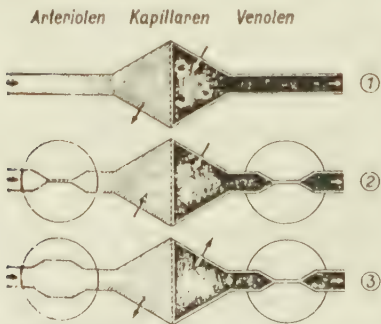


Abb. 2 Änderung der Endstrombahn („Vasomotion“).
Schematische Darstellung der schockspezifischen Vasomotion nach Messmer (1970)

Sphinkter zu einer Kreislaufzentralisation bzw. zu einer ischämischen Anoxie in den vorwiegend mit alpha-Rezeptoren ausgestatteten Gefäßgebieten Anlaß gibt. Dieser als reversibler Schock gekennzeichnete Zustand kann durch eine persistierende Konstriktion der postkapillären Sphinkter in den irreversiblen Schock übergehen. Die präkapillären Sphinkter haben unter Azidoseeinfluß ihren Tonus verloren.

Es kommt zu einer stagnierenden Anoxie; parallel zum ansteigenden hydrostatischen Kapillardruck und zu fortschreitenden Gefäßläsionen

setzt ein Abstrom von Plasma ins Interstitium ein; das intravasale Volumendefizit wird weiter vermehrt.

4.) Der Stoffwechsel im Schock

Die Plasmaverschiebungen führen zu den klassischen hypoxämischen Stoffwechselveränderungen (49). Die aerobe Glykolyse wird vorzugsweise durch das anaerobe Äquivalent ersetzt; minimale Energieausbeute und intrazelluläre Anhäufung von Milchsäure und Brenztraubensäure sind die direkten Folgen. Zitronensäurezyklus und Atmungskette sind blockiert. Die Synthetisierung von ATP gerät ins Defizit und es kommt laut M a r k g r a f zum Erliegen der verschieden-

ten energieabhängigen Funktionen. (33,34). Diese Transmineralisierung hat ein intrazelluläres Ödem zur Folge, das die Funktion sämtlicher Zellorganellen beeinträchtigt. Im Blut reichern sich Glukose, Fettsäuren und Aminosäuren an, da die Zellen der hypoxämischen Bezirke diese Produkte nicht metabolisieren können.

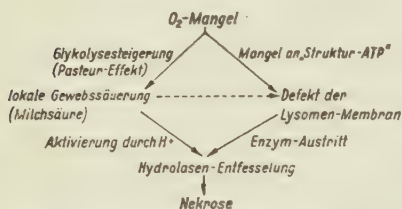


Abb. 3. Enzymopathologisch lokalisierbare Ursachen der ischämischen Gewebsnekrose nach Wieland (1964)

nen. Der Zelltod wird eingeleitet durch eine azidosebedingte Zerstörung der Lysosomenmembranen. Diese Zellorganellen enthalten in konzentrierter Form P r o t e i n a s e n und andere Hydrolasen, die nach Freisetzung die Zellstrukturen lytisch zersetzen (35).

5.) Das Gerinnungssystem und der Schock

Im Eingang wurde auf die zentrale Bedeutung der Schockentwicklung hingewiesen, vor allem im Hinblick auf die Spätfolgen. Eine ausschlaggebende Rolle in seiner Entwicklung spielen i n t r a v a s k u l ä r e Vorgänge. Schon frühzeitig waren Geldrollenbildung von Erythrozyten (r o t t e r s l u d g e) und Thrombozyten und Leukozyten (w e i ß e r s l u d g e) zu beobachten. (36,37). Das System der Blutgerinnung und das der Fibrinolyse befinden sich in einem "steady state". Die einzelnen Komponenten beider Systeme werden durch den Kreislauf miteinander verbunden (38). Dieses Stadium zeichnet sich durch eine Störung der Sauerstoffaufnahme aus, was wie N e u h o f nachwies für den weiteren Verlauf des Geschehens verhängnisvolle Folgen hat (39). Die Verbindung zwischen einzelnen Komponenten der Systeme Fibrinolyse, Gerinnung und Kinine sei im folgenden an Hand einer Skizze dargestellt.

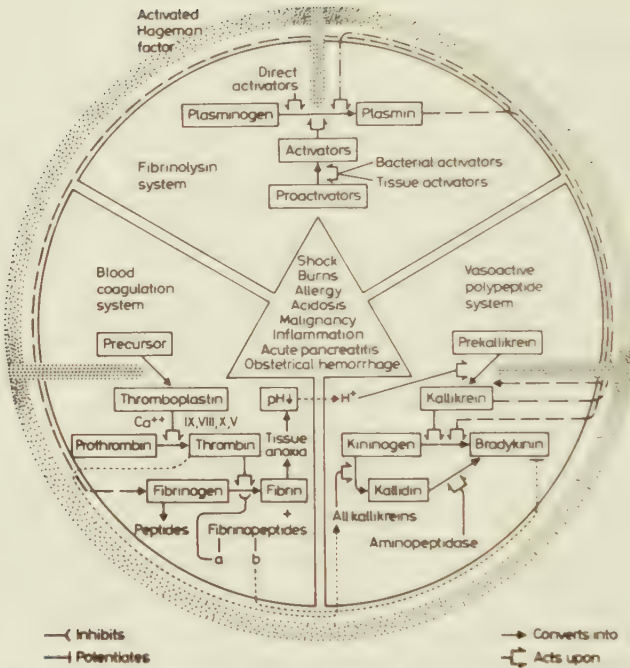


Fig. 4. The possible interrelationships among the fibrinolysis, blood coagulation, and vasoactive polypeptide systems and their possible involvement in shock states.

Nach N. Back und H. Wilkens, Neue Aspekte der
 Trasylol-Therapie Bd.3, Schattauer Verlag 1968

Wie wir aus dem bisher gesagten sehen ist der Verbrennungsschock ein multifaktorielles Geschehen, das in kurzer Zeit zu einer Dysregulation des Kreislaufs führt. Neben die Hypovolämie treten metabolische Störungen, die nicht erst bei einem Volumendefizit von 20 -30 %, sondern schon wesentlich früher zu befürchten sind. Sie sind nur dadurch zu erklären, daß alle für die Entstehung des Verbrennungsschocks maßgeblichen Ursachen schneller, intensiver und länger anhaltend wirken, wobei sie sich gegenseitig beeinflussen, überschneiden und verstärken. Diese metabolischen Störungen sind es, die nach "Normalisierung der klinischen Befunde" zu fortbestehenden pathologischen Veränderungen führen.

IV. : Vom lokalen Geschehen zum generalisierten Verbrennungssyndrom

1.) Die Theorie der Schockmediatoren

In diesem Zusammenhang ist von kardinaler Bedeutung wie sich aus der durch das thermische Trauma verursachten lokalen Schädigung ein generalisiertes Geschehen entwickelt. Werden lokal sog. Schockmediatoren frei, z.B. in Form freigesetzter Gewebsproteasen? Wenn ja, was sind das chemisch für Substanzen, wie wirken sie? Alle diese Fragen sind für das Verständnis der Pathophysiologie von zentraler Bedeutung und die restlose Aufklärung dieser Fragen würde helfen die Therapie optimaler zu gestalten. In dieser Arbeit soll versucht werden zur Klärung dieser Fragen beizutragen.

2.) Bisher nachgewiesenes Auftreten von Kininen

Die Beteiligung des Kininsystems an physiologischen und pathologischen Veränderungen kann man an Hand des Kininogenspiegels messen. Seine Veränderungen werden als Hinweis für einen gesteigerten Verbrauch des Kallikreinsubstrates und eine vermehrte Kininfreisetzung gedeutet. Die Änderungen des Kininogengehalts können nur dann als Anzeichen für seine Beteiligung an Organprozessen gedeutet werden, wenn sie nicht durch Veränderungen der Gesamt-Proteinkonzentration verursacht sind.

Z a c h und W e r l e wiesen nach, Daß Gewebsschädigungen jeder Art zu einer Vermehrung des Kallikreinsubstrates im Plasma führen. Präkallikreingehalt und Kininaseaktivität bleiben unverändert(50). Für die Beteiligung des Kininsystems an der Ödementwicklung in Rattenpfoten nach thermischer Gewebsschädigung spricht auch die Tatsache, daß dieses Ödem durch Hexadimethrinbromid bzw. SBTI über eine Hemmung der Kallikreinaktivierung signifikant vermindert wird (Zach, Werle).

Um die Mediatorenrolle der Kinine bei Entzündungen nachzuweisen versuchten W e b s t e r und E r d ö s das entstehende Ödem mit Kinininhibitoren zu unterdrücken. Es gelang dies beim Pfotenödem der Ratte mit Carboxypeptidase B und SBTI. Keiner dieser beiden Inhibitoren wirkt aber spezifisch auf das Kallikrein - Kinin-System (51,52).

1963 sammelten E d e r y und L e w i s die Lymphe aus Hundepfoten, die einem thermischen Trauma ausgesetzt waren und fanden darin eine signifikante Erhöhung der Kininogenase.

1966 untersuchten J a c o b s e n und W a a l e r mit derselben Versuchsanordnung die Auswirkungen eines thermischen Traumas an den Hinterpfoten von Hunden und Kaninchen. Sie konnten

eine Erhöhung des Lymphflusses und der Kininaseaktivität feststellen. Freies Plasmakinin oder Kininogenaseaktivität konnten sie aber nicht nachweisen (54).

Auch A r t u r s o n untersuchte 1969 die Lymphe von Hundepfoten nach deren thermischer Traumatisierung. Auch er konnte gleichzeitig mit einer erhöhten Gefäßpermeabilität eine erhöhte Kininaseaktivität feststellen (55).

B e r a l d o wies eine erhöhte Plasmakininaktivität bei Hunden nach, die in einen anaphylaktischen Schock versetzt worden waren (56).

V. : Pathophysiologie der Proteolyse bei Verbrennungen

1.) Der Zelluntergang

Drittgradige Verbrennungen bewirken eine Nekrose der oberflächlichen Hautschichten. Während diese Nekrose als derbe Gewebsplatte keiner Autolyse anheimfällt, werden in der darunterliegenden nekrobiotischen Zone aus den zugrunde gehenden Zellen Enzyme, Proenzyme und Polypeptide freigesetzt, die über den interstitiellen Raum und das Lymphbahnsystem in den Kreislauf geraten und so ihre Wirkung im ganzen Organismus entfalten können.

B a z i n und D e l a u n a y konnten nachweisen, daß im Plasma nach einem Trauma der Gehalt an Chymotrypsin, Aminopeptidasen und Carboxypeptidasen steigt (57).

2.) Die Rolle der Lysosomenproteinasen

In den Lysosomen der Zellen befinden sich laut D e D u v e Proteasen, die bei der Zerstörung der Zelle oder bei einer abnormen Permeabilitätsänderung ihrer Membranen freigesetzt werden (58). Laut M a r g g r a f kann die Aktivierung des proteolytischen Enzympotentials auch durch Sauerstoffmangel und eine Verschiebung des pH auf saure Werte erfolgen.

G r e u e r und Mitarbeiter wiesen nach, daß die freigesetzten Proteasen die zelleigenständigen Vorstufen proteolytischer Fermente in der Leberzelle aktivieren und ihre Entbindung in den Kreislauf veranlassen können (59).

3.) Die Beziehungen zwischen freigesetzten Proteinasen und dem Kininsystem

Die Studien von Greenbaum und Yamafuji wiesen darauf hin, daß die freigesetzten Proteasen direkt auf das Bradykininogen des Plasmas wirken und aus ihm Bradykinin abspalten. Bradykinin seinerseits zieht Leukozyten an, welche wiederum Hydrolasen freisetzen (60). Bertelli wies nach, daß die freigesetzten Proteasen zu einer vermehrten Thrombozytenaggregation führen, die ihrerseits Proteasen freisetzen. Bertelli konnte mit spezifischen Inhibitoren nachweisen, daß die proteolytische Aktivität des Plasmas nach einem Trauma um ein Vielfaches erhöht ist.

Spector und Wiloughby interpretierten diese Ergebnisse dahingehend, daß die aus dem zerfallenden Gewebe freigesetzten Proteasen die im Plasma befindlichen Kininogene aktivieren können und auch die Freisetzung biogener Amine z. B. aus den Mastzellen fördern (61).

Schon unter physiologischen Umständen finden z.B. durch das turnover der Zellen laufend proteolytische Vorgänge statt. Die in das Plasma gelangenden Proteasen werden durch die sich dort befindende Inhibitoren gehemmt. Bei Verbrennungen kommt es nun zu einem vermehrten Angebot proteolytischer Fermente und Zellabbauprodukte im strömenden Blut.

Solange die freiwerdenden und im Kreislaufsystem erscheinenden proteolytischen Enzyme gehemmt und inaktiviert werden können bleibt das Geschehen auf die lokale Wunde begrenzt. Erreicht aber diese enzymatische Kettenreaktion einen zu großen Umfang, sind die körpereigenen Inhibitorsysteme: α_1 -Antitrypsin, Inter- α_1 -Antitrypsin, α_2 -Makroglobulin nicht mehr in der Lage die Proteasen zu inhibieren, so kommt es zur enzymatischen Entgleisung und zur ubiquitären Schädigung aller Organsysteme.

Durch die Applikation von spezifischen Inhibitoren wie z.B. Trasylol^R kann versucht werden das Gleichgewicht zuungunsten der vasoaktiven Proteasen zu verschieben. Da an dem pathogenetischen Geschehen auch andere Faktoren als die Kinine beteiligt sind, wird es uns darauf ankommen das Maß ihrer Beteiligung durch Applikation spezifischer Inhibitoren zu eruieren.

B. Die versuchsanordnung.

I) Das verbrühungsschockmodell.

1.) Verschiedene Schockmodelle

Wie wir bei den Ausführungen über die verbrennungskrankheit beschrieben haben, werden dabei im menschlichen Körper drei Systeme aktiviert: das Kininsystem, das Gerinnungssystem, das fibrinolytische System und zudem Gewebsproteasen freigesetzt. Die Inhibitoren, die wir untersuchen wollen sind in ihrer Wirkung polyvalent. Diese komplexe Auswirkung ist mit biochemischen Methoden nur sehr schwer zu erfassen, bzw. läßt durch die labortechnische Bestimmung des einen oder anderen Parameters eine umfassende Antwort nicht zu.

Um die komplexe Wirkung der Inhibitoren in vivo zu untersuchen wählten wir aus den verschiedenen vorhandenen Schockmodellen wie Entblutungsschock, Dextranschock, Endotoxinschock, Peritonitischock etc. das Verbrühungsschockmodell aus. Da bei allen Schockformen nach einer gewissen Anlaufzeit sich die gleichen Grundmechanismen abspielen (Haberland 1970: "Prinzip der gleichen Endstrecke"), lassen sich die gewonnenen Ergebnisse mit Einschränkungen auch auf andere Schockformen übertragen. Nach Bückow et al. brachten Therapieergebnisse mit Inhibitoren bei anderen Schockmodellen keine einheitlichen Ergebnisse und waren damit quantitativ schlecht auswertbar. Das Überhitzungsmodell erweist sich als wesentlich günstiger.

So gesehen bietet im Vergleich zu den anderen Methoden das Verbrühungsschockmodell folgende Vorteile:

1. Es ist mit nicht allzugroßem labortechnischen Aufwand durchführbar.
2. Die Verbrühung der Tiere ist relativ exakt reproduzierbar.
3. Eine große Anzahl von Tieren ist in relativ kurzer Zeit testbar.
4. Bei genügend großen Serien lassen sich die Ergebnisse statistisch auswerten und verifizieren.
5. Die Parameter Absterbe- bzw. Überlebensrate und die Überlebenszeit sind exakt zu bestimmen und trotz der Einfachheit die wichtigsten therapeutischen Kriterien.

Zur Erzielung eines Verbrennungstraumas sind in der Literatur schon verschiedene Modelle beschrieben worden :

- durch Berührung mit einem Brandeisen
Brooks und Mitarbeiter 1952 (63)
- mittels Lichtbogen
Pears und Kingsley (64)
- mit einer Bunsenbrennerflamme
Grisola und Mitarbeiter (65)
- durch Verbrühung mit heißem Wasser
McCarthy
Arturson
Schild und Nilsson (66)

Da bei der Verbrühungsmethode Verbrennungsfläche (Eintauchtiefe) und Verbrennungsgrad (Verbrennungszeit, Temperatur) kontrollierbar sind ist sie die am häufigsten gewählte Methode, um einen Verbrennungsschock zu erzeugen.

Um einen Schock zu erzielen muß man ausgedehnte Hautflächen verbrühen. Dies wurde dadurch erzielt, daß man die Tiere teilweise bis zur Hüfte oder sogar bis zur Axille in heißes Wasser steckte. (Bertelli). Dabei kam es zu unerwünschten Schädigungen an Schwanz und Pfoten, sowie an urethralen und analen Orifizen, die zu Nekrosen und Infektionen führten (B. Schildt und Nilsson). Besonders fragwürdig scheint dabei die direkte Hitzeeinwirkung auf den Bauch und damit die Därme der Tiere, was die Freisetzung von Endotoxinen aus den Darmbakterien zur Folge hat. Diese können die hitzegeschädigte Darmwand durchdringen und bringen damit einen nicht kontrollierbaren, unerwünschten Faktor mit ins Spiel (McCarthy).

Wir wählten deshalb die von McCarthy 1945 entwickelte Methode der "back-burn-procedure", die 1964 von dem schwedischen Spezialisten für Verbrennungskrankheiten, Arturson weiter standardisiert wurde. Die Extremitäten bleiben bei dieser Methode funktionsfähig und das Tier behält seine Bewegungsfreiheit. Ebenso sind die körperlichen Funktionen der Ausscheidungsorgane nicht beeinträchtigt. Weiterhin haben die Tiere nicht mehr die Möglichkeit das verbrühte Gewebe aufzufressen, wodurch die Komplikationen einer zusätzlichen Blutung verhindert werden; zudem bleibt die i.p. und i.v. Injektionsmöglichkeit erhalten.

3.) Das Versuchstier

Bei allen Versuchen wurden Tiere vom gleichen Stamm verwendet : jungfräuliche Sprague-Dawley-Ratten. Sie wurden von der Versuchstieranstalt Bäumler in Wolfratshausen bei München bezogen und jeweils eine Woche vor der Verbrühung unter standardisierten Be-

Ämungen in Sammelkäfigen im Tierstall gehalten. Sie erhielten bis 24 Std. vor Versuchsbeginn Altromin-Standardfutter, Wasser ad libitum. Eine Stunde vor dem Beginn des Experimentes wurde die benötigte Anzahl von Tieren mit dem Gewicht von 200 ± 5 gr aussortiert. Die Raumtemperatur wurde auf durchschnittlich 27 C gehalten. H o r s t, M e n d e l und B e n e d i c t haben festgestellt, daß bei dieser Temperatur die geringste Stoffwechselrate, bzw. ein Zustand des Temperaturgleichgewichts herrscht. Nach der Verbrühung wurden die Tiere in durchsichtigen Makrolon^R-Einzelkäfigen gehalten; dies verhinderte Kannibalismus und ermöglichte ein genaues Beobachten der Tiere.

4.) Technik und Versuchsbedingungen während des Verbrühens

Die Verbrühung des Rückens der Ratte wurde bei konstanter Temperatur von $93^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ in einem Laborwasserbad vorgenommen. Der Zusatz von Detergentien stellte die erwünschte gleichmäßige Benetzung sicher und die Wassertemperatur wurde mittels Thermostat und Umwälzanlage (elektrisch betriebener Quirl) zeitlich und räumlich konstant gehalten. Ca. 45 Min. vor dem Versuch wurden die ungeschorenen Tiere mit 2 ml/ Tier (= 10 ml/ kg) 3,0 %igem Chloralhydrat anästhesiert. Im Gegensatz dazu benutzte M i l e s D. M c C a r t h y Äther als Anästhetikum, was allerdings eine genaue Kontrolle der applizierten Menge nicht zuläßt. In betäubtem Zustand wurden die Tiere am Rücken und bis auf einen schmalen Streifen auch am Bauch geschoren und anschließend mit Pilca^R enthaart. Um ein Auskühlen der Tiere in diesem Zustand zu verhindern, wurden sie mit einem Heizstrahler gewärmt. In umfangreichen Vorversuchen haben wir festgestellt, daß ein zusätzliches Enthaaren nach dem Scheren für ein exaktes Ergebnis erforderlich ist. Denn in dem feinen, nach der Schur noch verbleibendem Haarpolster setzen sich Luftblasen fest, die dort wo sie auftreten, wie eine Isolierschicht wirken. Wir beabsichtigten aber eine über die gesamte Verbrühungsfläche gleichmäßige Temperatureinwirkung. So bedienten wir uns des Enthaarungsmittels Pilca^R um einen gleichmäßigen Wasserkontakt zu erreichen. Aber erst die Sicherstellung der gleichmäßigen Benetzung - durch den Zusatz eines Detergentiums im Laborwasserbad -, wie schon erwähnt, brachte die erwünschte Konstanz der Temperatureinwirkung auf die Verbrühungsfläche.

Die Verbrühungsmethode nach M i l e s D. M c C a r t h y läßt keine genau kontrollierbare Eintauchtiefe und damit auch kein konstant großes Verbrennungsareal zu. Auf Grund dessen verfahren wir wie folgt: Die Ratte, an Vorder- und Hinterfüßen mit-

tels Leukoplast^R gefesselt, wurde auf eine gebogene Kramerschiene gespannt, der Kopf hochgebunden, und der Schwanz zwischen den Hinterfüßen hindurchgezogen. So erreichten wir, daß keine Körperöffnung mit in das Verbrennungsareal einbezogen wurde. Das Verbrennungsareal war in allen Versuchen konstant: es betrug 38 % der Körperoberfläche. Berechnet wurde es nach der Formel von L e e

$$A : \text{Oberfläche in cm}^2$$
$$A = K \cdot W^{\frac{2}{3}} \quad W : \text{Körpergewicht in Gramm}$$
$$K : 10$$

Wir bestimmten die Verbrühungsfläche, indem der Umfang des verbrannten Areals auf ein Stück entwickelten Röntgenfilm aufgetragen und ausgeschnitten wurde. Mit der Analysenwaage wurde im Verhältnis zu einer bekannt großen Vergleichsfläche die cm^2 -Zahl bestimmt. Mc Carthy gab an, daß bei einem solchen Vorgehen die Fehlermöglichkeit lediglich $\pm 2\%$ betrage. Dies bestätigte auch U l r i c h H a u p t (Persönliche Mitteilung; Institut für Experimentelle Chirurgie an der Universität München). Um unsere Ergebnisse abzusichern, legten wir großen Wert auf die rückkoppelnde Kontrolle der statistischen Auswertung. Die Verbrühungszeit, mittels Stoppuhr kontrolliert, betrug jeweils 30 sec. bei 93°C Wassertemperatur. In Voruntersuchungen haben wir durch Variieren der Verbrühungszeit und der Verbrühungstemperatur festgestellt, daß bei dieser Kombination 100 % der Versuchstiere sterben. Die mittlere Überlebenszeit der Kontrolltiere betrug 6 Std. 30 Min. Die Änderungen die sich in den Überlebenszeiten und den Überlebensraten ergaben, benutzten wir als Maß für die Wirksamkeit der jeweils getesteten Substanzen. Die hohe Verbrühungstemperatur erwies sich als erforderlich, denn schon ihre Herabsetzung um nur 2°C ließ die Mortalität der Tiere von 100 % auf 10 % sinken. Dies schien uns auch die hohe Empfindlichkeit der gewählten Versuchsanordnung zu demonstrieren. Da mit der Gabe der Testsubstanzen den Tieren auch Flüssigkeit zugeführt wurde bekamen die Kontrolltiere je 7 ml (Ringerlösung und Chloralhydrat). Die Testgruppe bekam die jeweils getestete Substanz in einem ebenso großem Volumen von Ringerlösung zugeführt. Auf diese Weise wurden sowohl für die Kontroll- als auch für die Testgruppe identische Bedingungen geschaffen. Nach dem Versuch wurden die Tiere in den nächsten 48 Stunden alle 30 Minuten kontrolliert.

5.) Weitere Bemerkungen zu den Versuchen

Während der Versuche konnten wir feststellen, daß die Tiere nicht immer gleich reagierten; Veränderungen in ihrem Verhalten fielen vor allem in Abhängigkeit von der Tageszeit als auch den Witterungsverhältnissen auf. Insbesondere an schwülen gewitterigen Tagen war die Resistenz der Tiere gegenüber Traumen stark beeinträchtigt. Dies veranlasste uns bei auffälligen Abweichungen der Kontrolltiere von der Norm, die an solchen Tagen gewonnenen Ergebnisse zu verwerfen. Diese meteorologische Abhängigkeit ist auch schon H a b e r l a n d aufgefallen. Auch die Verwendung von jungfräulichen Ratten ist nicht zufällig. N. B a c k et al. schrieben in "Proteases and Protease-inhibitors in exp. shockstates", daß die weiblichen Tiere in ihrem Hormonhaushalt, was die Verbrennungskrankheit anbetrifft, wesentlich konstantere Werte aufweisen als die männlichen. Auch die Gewichtskonstanz wurde sehr streng gehandhabt, da auch dieser Faktor unsere Parameter stark beeinflusste. Ansonsten waren wir bemüht, die Versuche stets in gleicher Art und Weise und unter gleichen Bedingungen durchzuführen. Dies ging soweit, daß die einzelnen Schritte des Versuchs jeweils von ein und derselben Person durchgeführt wurden.

Nachträglich soll noch der Grund erwähnt werden, der uns veranlaßte die Tiere zu verbrühen und nicht zu verbrennen. Bei der Verbrennung entstehen durch Polymerisierung von normalerweise schon vorhandenen Lipoproteinen der Haut Toxine. Die Bildung des großmolekularen Verbrennungstoxins erfolgt nur bei der "trockenen Verbrennung", d.h. bei hohen Temperaturen, die zu völligem Wasserverlust der Haut führen. Dementsprechend gehen Verbrühungen nicht mit der Bildung dieses Toxins einher. Dies war insofern für unsere Experimente günstig, als auf diese Weise eine Einwirkung dieses Toxins auf unsere Parameter vermieden werden konnte.

C. Experimentelle Untersuchungen

I) Carboxypeptidase B und Sojabohmentrypsininhibitor.

In der Pathophysiologie von verschiedenen Schockmodellen und speziell des Verbrühungsschocks wird dem Kallikrein-Kinin-System eine wesentliche Rolle zugeschrieben. Es konnte jedoch bisher die Beteiligung des Kininsystems nicht direkt bewiesen werden, da freie Kinine eine nur äußerst kurze Halbwertszeit besitzen und es daher noch nicht gelungen ist diese nachzuweisen. Ein indirekter Nachweis durch einen Abfall des Kininogenspiegels wurde durch W e r l e und Mitarbeiter beim Endotoxinschock, beim hämorrhagischen Schock und beim Wärmeschock an Ratten nachgewiesen(90).

Um die Beteiligung des Kininsystems bei pathologischen Prozessen nachzuweisen oder widerlegen zu können bedient man sich seit langem der Methode seiner enzymatischen Inaktivierung. Da die Kinine Polypeptide sind kam man sehr bald auf den Gedanken sich zu ihrer Inaktivierung der Carboxypeptidasen zu bedienen, die in der Chemie zur Aminosäuresequenzanalyse benutzt werden. E r d ö s stellte 1962 fest, daß Carboxypeptidase B den biologischen Effekt von Bradykinin und Kallidin in vitro etwa 50 bis 100 mal stärker hemmt als Chymotrypsin (68). Die Inaktivierung wird der Abspaltung des C-terminalen Arginins zugeschrieben. Die Frage die nun interessierte war, inwieweit dieses Enzym den in vivo-Effekt des Kininsystems vermindern würde. Zahlreiche Experimente wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt.

S t o c k und E i g l e r versetzten Ratten in den Tourniquet-Schock. Den Tieren wurden unmittelbar vor dem Trauma 50 U /kg Carboxypeptidase B i.v. verabreicht. Die Autoren stellten fest, daß die so vorbehandelten Tiere gegenüber der Kontrollgruppe keine Verlängerung der Überlebenszeit erfuhren. Dieses Ergebnis würde gegen eine wesentliche Beteiligung des Kinin-Systems beim Tourniquet-Schock sprechen(69).

Bei den von E r d ö s und Mitarbeitern an Meerschweinchen und Kaninchen durchgeführten Versuchen wurde die blutdrucksenkende und permeabilitätserhöhende Wirkung von Bradykinin und Kallidin durch eine parallel erfolgende Applikation von 200 U /kg Carboxypeptidase B verhindert (70).

Erdös wies nach, daß das Plasma der Versuchstiere eine Carboxypeptidase enthält, die von der Carboxypeptidase B unterschieden werden kann. Die Aktivität der Plasmacarboxypeptidase ist jedoch

sehr gering in Abwesenheit von Ca^{++} . Nichtsdestoweniger konnte der Effekt der Kinine auf den Blutdruck verstärkt werden durch Inaktivierung der sie abbauenden Plasmacarboxypeptidase (71). Laut Erdös korrelieren das Absinken des Enzymspiegels im Blut und die Wiederkehr des Bradykinineffektes so gut, daß man von einem spezifischen Effekt der Carboxypeptidase B auf die Kinine sprechen kann. Dies um so mehr, als eine durch Histamin verursachte Hypotension durch Carboxypeptidase B nicht verhindert werden konnte

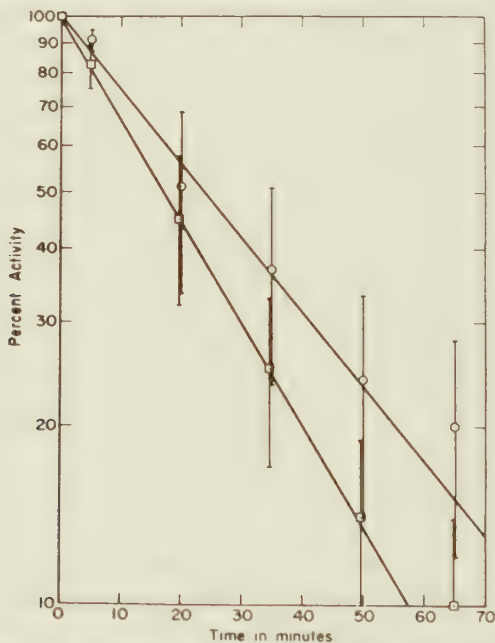


FIG. 2. The relationship between decrease of injected carboxypeptidase B level in blood □—□ and return of bradykinin effect on blood pressure ○—○.
Ordinate: % activity of enzyme and % block of bradykinin. Abscissa: time in minutes. The experiments were done in four rabbits. The points show the mean values, the vertical lines $\pm$ 1 S.E.

Auch bei der Ratte konnte Erdös den oben beschriebenen Effekt mit einer Dosis von 3,6 mg/kg (400 U/kg) Carb.B wiederholen. Die an diesem Tier durchgeführten Untersuchungen über den Verbleib der Carb.B nach derer exogener Zufuhr ergaben, daß es sich in noch aktiver Form in allen Geweben verteilt. Eine geringe Menge wird in der Leber abgebaut, der größte Teil in noch aktiver Form durch die Niere im Urin ausgeschieden (72).

Ausgehend von der Überlegung, daß eine Applikation des Kininabbauenden Enzyms Carb.B dieses in seinen Auswirkungen beeinträchtigen müßte und somit nicht ohne Einfluß auf unsere Parameter Überlebensrate und Überlebenszeit bleiben würde, entschloßen wir uns zu eigenen Versuchen.

Wir injizierten 20 Ratten eine halbe Stunde vor der Verbrühung 200 U / kg Carb.B . Die Injektion wurde noch zwei mal in Abständen von einer halben Stunde wiederholt um einen genügend hohen Spiegel des kininabbauenden Enzyms zu gewährleisten. Die Ergebnisse des Versuches sind in Diagrammen auf den nächsten Seiten dargestellt. Von den 20 verbrühten Tieren überlebten sieben, was einer Senkung der Mortalität im Vergleich zu den Kontrolltieren von 100 auf 65 % entspricht. Auch die Verlängerung der Überlebenszeit war mit einem $p > 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe (durchgerechnet nach dem Student-t-Test) hochsignifikant.

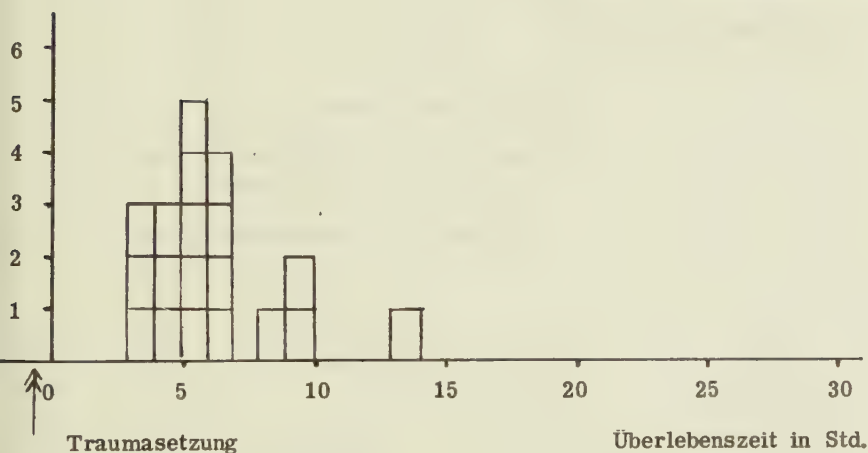
1. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

MORTALITÄT NACH X STD.

KONTROLLGRUPPE

5 ml Ringerlösung i.p.

n = 19 Ratten Überlebende: 0 Rtttn.



Applikation 45 min vor Verbrühung

1 Kästchen = 1 Ratte, verstorben nach der X. Stunde!

Da uns das mit der Carboxypeptidase B erzielte Ergebnis als sehr wesentlich in seiner Aussagekraft erschien und es im Widerspruch zu einigen in der Literatur aufgeführten Ergebnissen stand (siehe oben) überprüften wir es zu einem späteren Zeitpunkt. Es wurde mit denselben Ergebnissen reproduziert und dürfte somit als gesichert gelten. Angesichts der spezifischen Wirkung, die die Carboxypeptidase B auf das Kininsystem hat sprechen diese in vivo erzielten Ergebnisse für eine maßgebliche Rolle des Kininsystems beim Zustandekommen des Verbrühungsschocks. Um so mehr als die i.m. Applikation von Kallikrein unter gleichen Versuchsbedingungen eine Verkürzung der Überlebensrate und der Überlebenszeit im Vergleich mit den Kontrolltieren mit sich brachte (Dissertation Annemarie Berkenheier, München 1974).

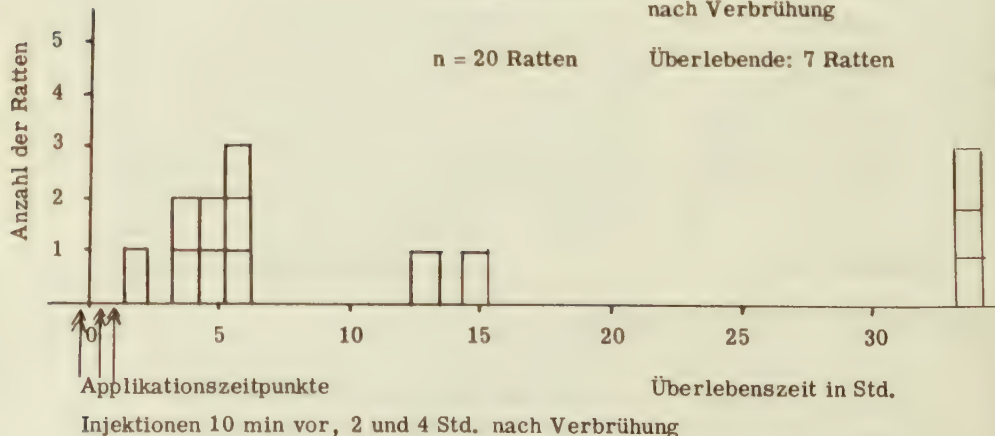
2. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

MORTALITÄT NACH X STD.

CARBOXYPEPTIDASE B

3 x 200 U/kg i.p. 10 min vor, 2, 4 Std.
nach Verbrühung

n = 20 Ratten Überlebende: 7 Ratten



VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH:

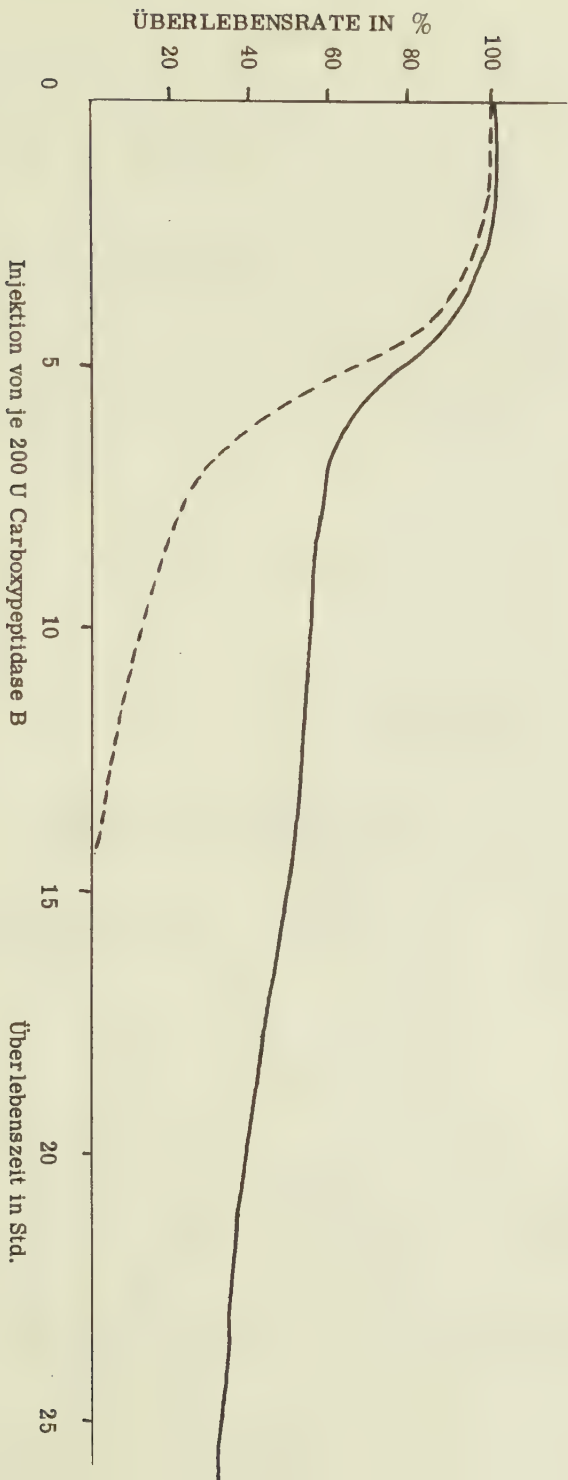
—— CARBOXYPEPTIDASE B

n = 20 / Überleb.: 7 Ratten

3 x 200 U / kg

--- KONTROLLGRUPPE

n = 20 / Überleb.: 0 Ratten



Injektion von je 200 U Carboxypeptidase B

Überlebenszeit in Std.

Überlebensrate in % nach X Std.

Nach S p e c t o r und W i l l o u g h b y vermag der Soja-Bohnen-Trypsin-Inhibitor (SBTI) das Plasmin und das Plasmakallikrein zu hemmen. Der SBTI ist ein Proteinaseinhibitor pflanzlichen Ursprungs mit einem Molekulargewicht von 22 000 . Wir applizierten 21 Ratten eine Stunde vor der Verbrühung je 100 mg/kg SBTI. Aus den nachfolgenden Diagrammen geht hervor, daß von 21 verbrühten Tieren fünf das Trauma überlebt haben. Das Maximum der Mortalitätskurve, das bei den Kontrolltieren zwischen vier und fünf Stunden liegt, ist bei den mit SBTI behandelten Tieren gegen sieben bis acht Stunden nach dem Trauma verschoben. Die Überlebensrate wurde von 100 auf 74 % gesenkt.

3. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

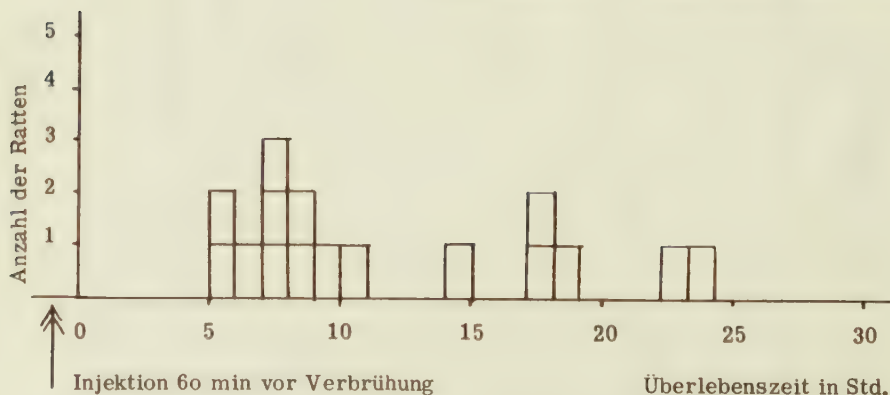
MORTALITÄT NACH X STD.

SOJABOHNENTRYPSININHIBITOR

100 mg/kg i. p.

n = 21 Ratten

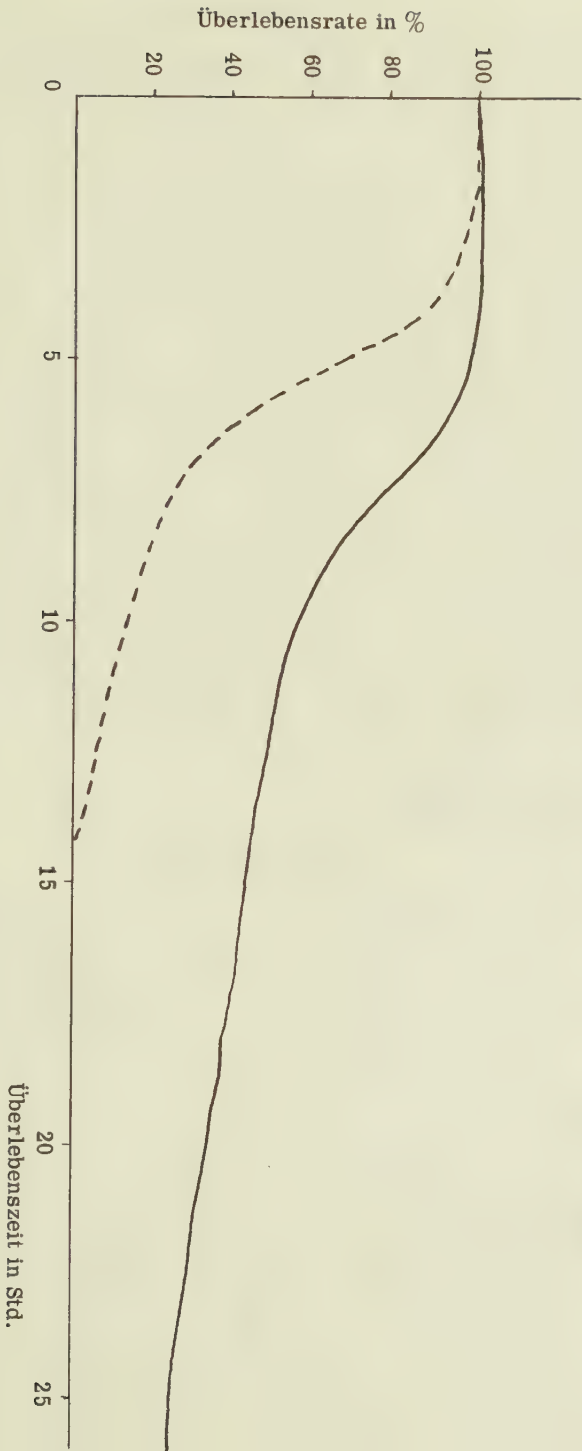
Überlebende: 5 Ratten



VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH:

———— SOLABOHNENINHIBITOR n = 21 / Überlebende: 5 Ratten
100 mg / kg i. p.

- - - - - KONTROLLGRUPPE n = 19 / Überlebende: 0 Ratten



ÜBERLEBENSRATE IN % NACH X STD.

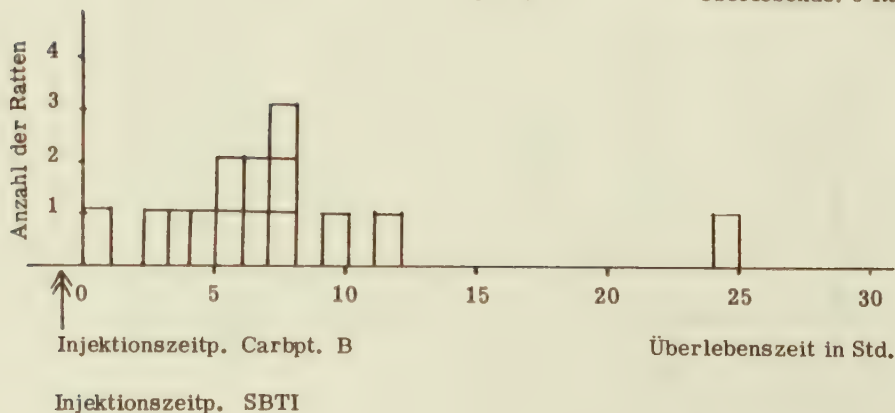
Überlebenszeit in Std.

Beim Vergleich der mit Carb.B und der mit SBTI behandelten Tiere interessierte uns die Frage ob sich zwischen beiden signifikante Unterschiede nachweisen lassen würden. Für diese Fragestellung eignet sich die modifizierte Wilcoxon - Mann - Whitney Statistik. Mit diesem Signifikanztest für zwei zensierte Stichproben lassen sich sowohl die Überlebensrate als auch die Überlebenszeit in die Untersuchung einbeziehen; auch ist hierbei die Normalverteilung unseren Verhältnissen ähnlich. Für technische Einzelheiten sei auf die Publikation im Journal of the American Statistic Ass. S.125-138, Bd.50(1960) verwiesen. Der Vergleich der mit Carb.B und SBTI erzielten Ergebnisse ergab keine statistische Signifikanz die über das von uns geforderte 5% Niveau hinausgehen würde. Da jedoch im Vergleich der Überlebensratendiagramme vor allem in den kritischen ersten sieben Stunden die mit SBTI behandelten Tiere besser abschnitten, führten wir einen weiteren Versuch durch in welchem beide Mittel in derselben Dosierung wie vorher, aber kombiniert verabreicht wurden. Das Diagramm auf Seite 25 zeigt, daß keine Addierung der Effekte erzielt werden konnte. Die statistische Auswertung ergab zwar auch hier eine hohe Signifikanz gegenüber den nur mit Ringerlösung vorbehandelten Tieren, die Abweichungen von den Werten mit Carb.B und SBTI waren beim Kombinationsversuch statistisch nicht signifikant.

4. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH:

MORTALITÄT
NACH X STD.

KOMBINATION VON
SBTI 100 mg/kg i. p.
+ Carboxypeptidase B 3 x 200 U/kg i. p.
n = 19 Überlebende: 5 Ratten



VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH:

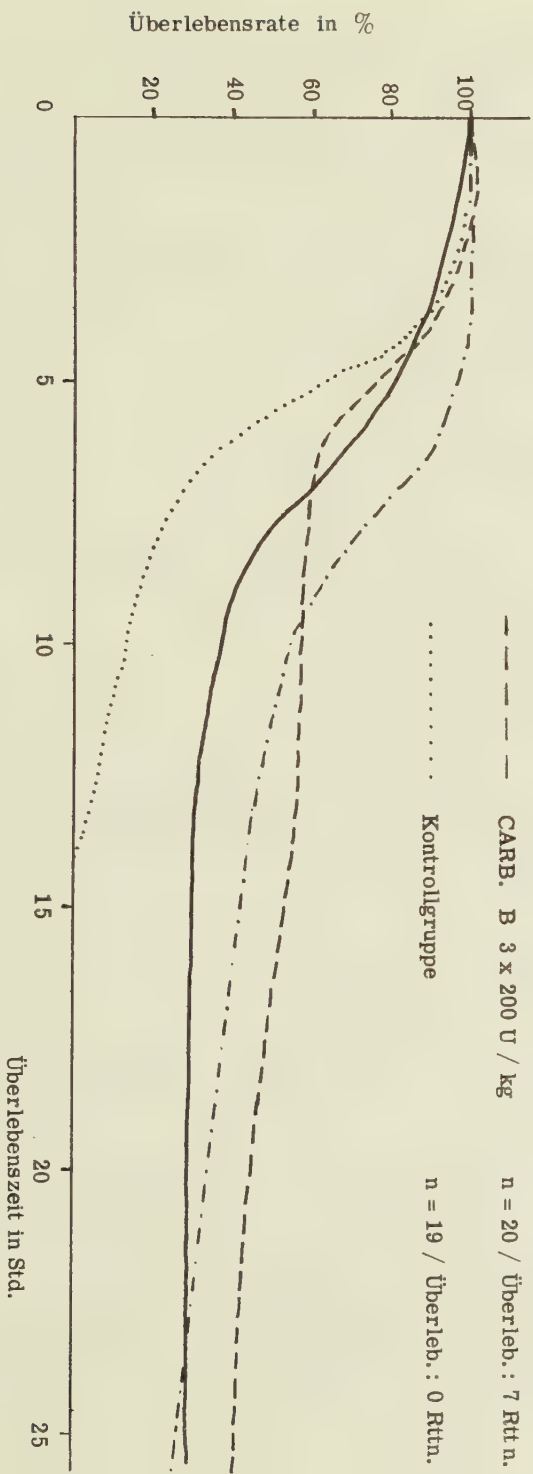
KOMBINATION VON

SBTI + CARB. B n = 19 / Überleb.: 5 Rtt.
100 mg/kg 3 x 200 U / kg

SBTI 100 mg / kg n = 21 / Überleb.: 21 Rtt.

CARB. B 3 x 200 U / kg n = 20 / Überleb.: 7 Rtt.

Kontrollgruppe n = 19 / Überleb.: 0 Rtt.



ÜBERLEBENSRATE IN % NACH X STD.

Überlebenszeit in Std.

2.) Die Rolle des Histamins: Antistin und 5-OH-Tryptophan

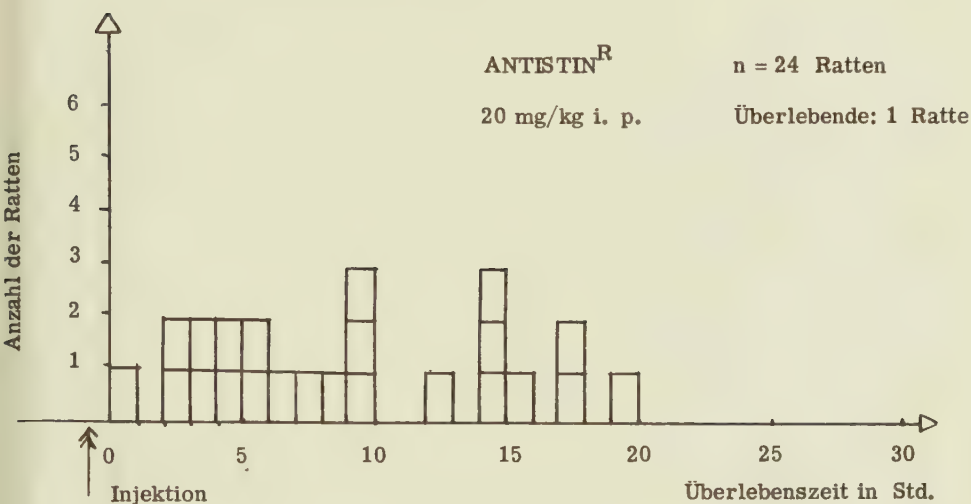
S p e c t o r und W i l l o u g h b y stellten fest, daß die Permeabilitätsänderung nach thermischen Traumen in zwei Phasen abläuft: die erste erreicht ihr Maximum nach 15-20 Min. und klingt nach einer Stunde wieder ab. Die zweite Phase hat ihr Maximum nach 3-4 Std. erreicht(73). Dieselben Autoren konnten zeigen, daß der Beginn der ersten Phase der erhöhten Gefäßpermeabilität durch Antihistaminika verzögert werden kann. Sie postulierten daraus, daß die erste Phase durch Histamin, welches z.B. bei der Zerstörung von Zellen durch ein thermisches Trauma freigesetzt wird, verursacht wird. W i l h e l m und B r e n d a M a s o n konnten diesen Histamineffekt bei Versuchen an Meerschweinchen mit Antihistaminika auch unterdrücken (74).

W e r l e und T a e g e r stellten bei Ratten fest, daß die Entwicklung des Pfotenödems nach Antistingingabe gehemmt wird. Inwieweit der Effekt dieser Antihistaminika auf einer Antikininwirkung beruht ist noch nicht abgeklärt (91).

Davon ausgehend, daß eine wesentliche Beteiligung des Histamins am Geschehen nicht ohne Auswirkungen auf den Verlauf der Überlebensrate und der Überlebenszeit sein dürfte, verabreichten wir den Tieren das Antihistaminikum A n t i s t i n in einer Dosis von 2 mg / kg . Das Resultat war eine statistisch relevante Verlängerung der Überlebenszeit! Zwar sind in den ersten Stunden keine deutlichen Abweichungen von der Kontrollgruppe sichtbar; doch der positive weitere Verlauf muß auf eine Wirkung des Antihistaminikums bezogen werden. Auch hier wird gut sichtbar, daß viele Effekte erst nach der kritischen ersten Zeit zum Tragen kommen. Das z.B. das Pfotenödem der Ratte durch Antihistaminika nicht vermindert werden kann, sollte nicht wie oft geschehen zu dem Schluß verleiten, es spiele hierbei das Histamin keine Rolle. Erst der weitere Verlauf zeigt manchmal Effekte. Umgekehrt interessierte uns, ob die Applikation einer Substanz die Ödeme erzeugt Auswirkungen auf die Versuchstiere haben würde. Als Testsubstanz wählten wir die Aminosäure 5 - O H - T r y p t o p h a n , aus der im Organismus durch Decarboxylierung 5 - O H - T r y p t a m i n (Serotonin) entsteht. In diesem Experiment folgte der Verlauf der Überlebensrate in Abhängigkeit von der Zeit im Wesentlichen dem der Kontrollgruppe. Dies läßt den Schluß zu, daß in unserem Schockmodell die ödemfördernden Substanzen ihre Wirkung bereits maximal entfaltet haben und somit eine weitere Steigerung nicht mehr möglich ist.

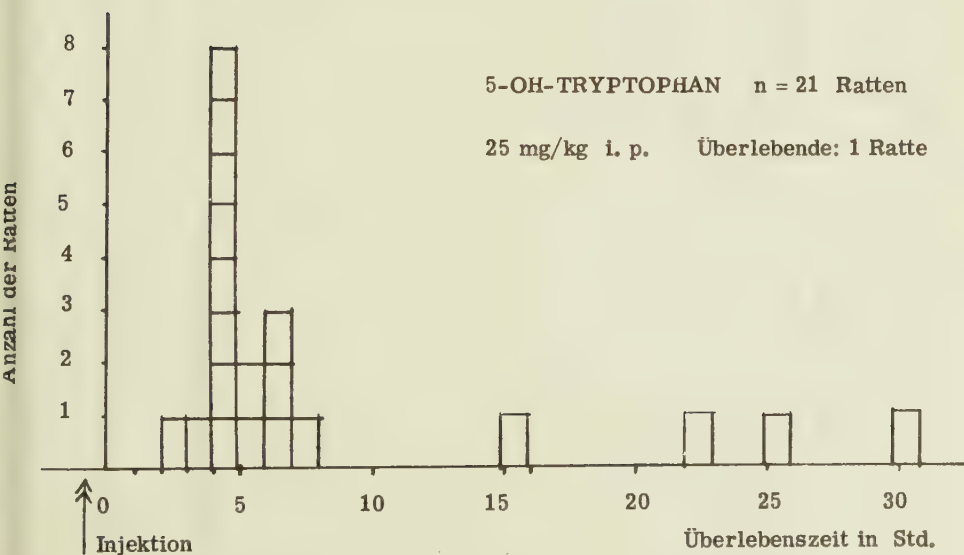
5. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

MORTALITÄT NACH X STD.



6. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

MORTALITÄT NACH X STD.



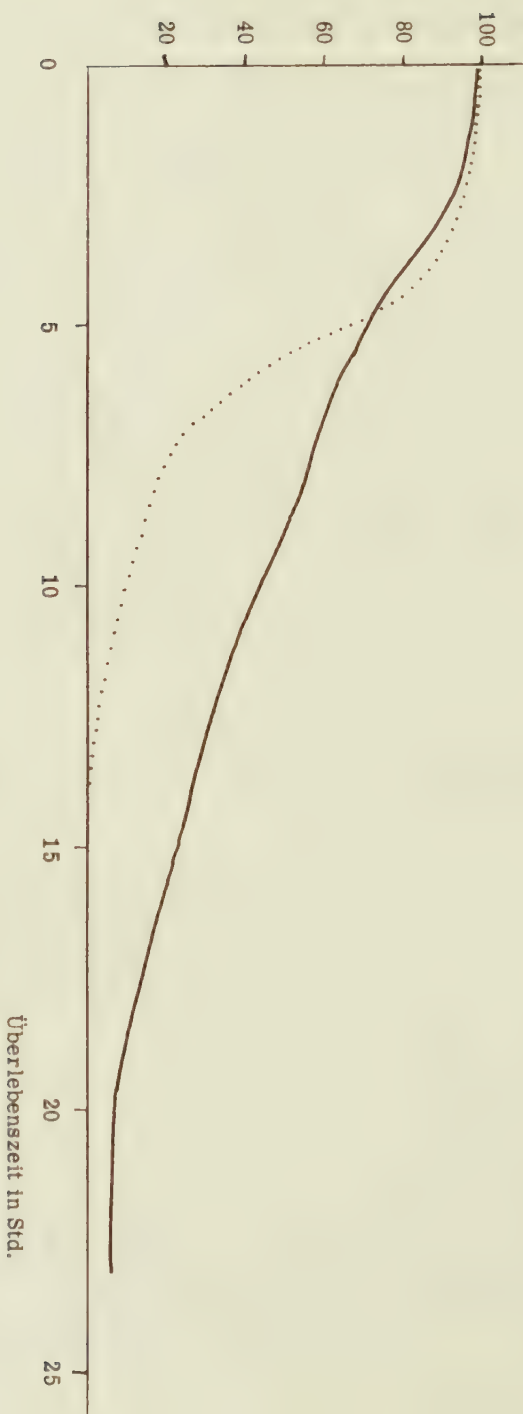
VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH:

ANTISTIN^R
2 mg / kg

n = 24 / Überlebende: 1 Ratte

..... KONTROLLGRUPPE

n = 19 / Überlebende: 0 Ratten



ÜBERLEBENSRATE IN % nach X Std.

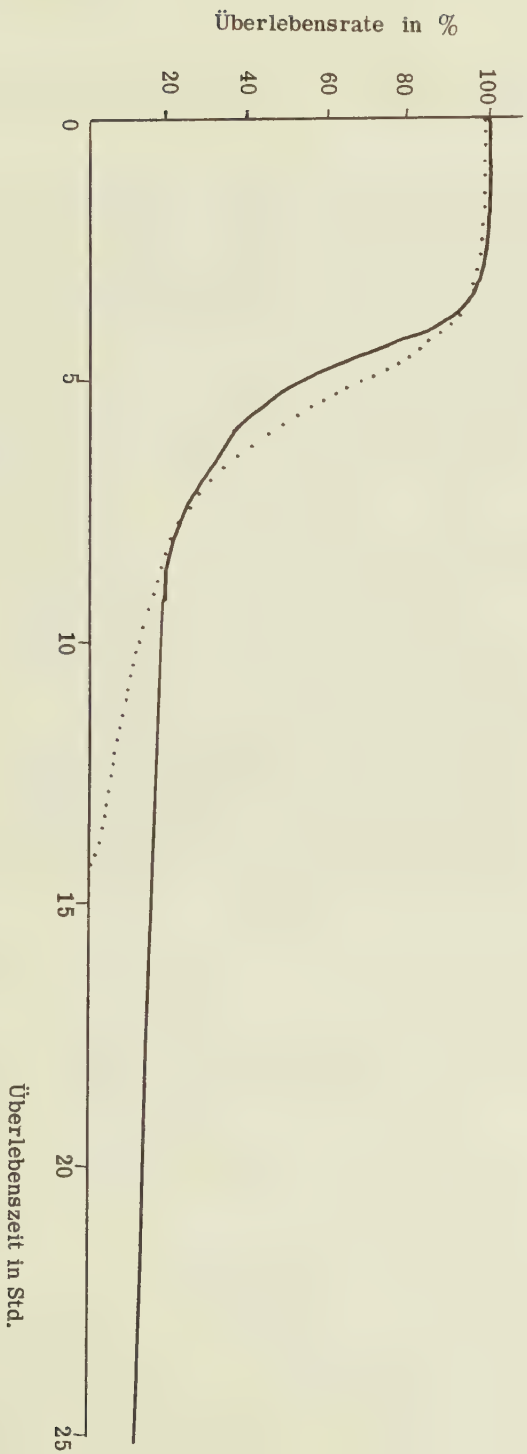
VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH: ——— 5- OH - TRYPTOPHAN

n = 21 / Überl.: 1 Ratte

25 mg / kg

..... KONTROLLGRUPPE

n = 19 / Überl.: 0 Ratten



ÜBERLEBENSRATE IN % NACH X STD.

Überlebenszeit in Std.

Die Ergebnisse der Versuche mit Antistin^R und 5-OH-Tryptophan wurden statistisch nach dem Student-t-Test ausgewertet. Bei diesem Test wird vorausgesetzt, daß beide Stichproben aus normalverteilten Grundgesamtheiten entnommen werden. Die zu prüfende Nullhypothese lautet: Beide Stichproben stammen aus der gleichen Grundgesamtheit. Diese Hypothese kann abgelehnt werden, wenn die Differenz zwischen den beiden Mittelwerten so groß ist, daß die Wahrscheinlichkeit dafür, eine gleich große oder sogar noch größere Differenz zu erhalten kleiner ist als eine vorgegebene kleine Irrtumswahrscheinlichkeit. Bei großen Stichproben kann man von der Tatsache Gebrauch machen, daß die Studentsche Normalverteilung asymptotisch in eine Normalverteilung mit dem Mittelwert "0" und Varianz "1" übergeht und somit die Testgröße T mit den Werten dieser Verteilungsfunktion vergleichen. Wo die erwähnten Voraussetzungen des Student-t-Tests nicht erfüllt waren bedienten wir uns der Wilcoxon- Mannhitney Statistik.

Für Antistin waren die Abweichungen nach Student von der Kontrollgruppe mit einem $p < 0,001$ hochsignifikant; für 5-OH-Tryptophan konnte keine signifikante Abweichung nachgewiesen werden. Zur Statistik soll hier noch angemerkt werden, daß für unsere spezielle Fragestellung das Beobachten des Verlaufs der Überlebensrate weit aussagekräftiger ist.

3.) Die Rolle des Gerinnungssystems: Hexadimethrinbromid

Wie in unseren Ausführungen über die Pathophysiologie des Schocks dargestellt wurde handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen in welchem das Gerinnungssystem und das fibrinolytische System mit dem Kininsystem eng verzahnt sind. Margolis postulierte 1960, daß die intravaskuläre Aktivierung des Kininsystems über eine Aktivierung des Hagemann-Faktors zustande kommt(75). Der Hagemann-Faktor leitet auch die Blutgerinnung und die Fibrinolyse ein. Der Hagemann-Faktor führt zur Kininbildung über eine Aktivierung des Präkallikreins (76).

Armstrong und Stewart berichteten 1962, daß Hexadimethrinbromid die Bildung von Plasmakininen hemmt (77). Leme und Rocha Silva fanden im Perfusat des Pfotenödems der Ratte nach Applikation von Hexadimethrinbromid eine Verminderung des Kininspiegels (78). Hexadimethrinbromid selber ist eine Substanz, die klinisch zur Neutralisierung der Antokoagulationswirkung des Heparins benutzt wird. Hexadimethrinbromid beeinflusst lediglich die Aktivierung des Präkallikreins; auf die enzymatische Aktivität des bereits gebildeten kininbildenden Enzyms hat es keinen Einfluß.

Eine der Auswirkungen der erhöhten Permeabilität ist die Bluteindickung mit einer daraus folgenden Aktivierung der Blutgerinnung und zwar über den Hagemann-Faktor. Eine wesentliche Aktivierung des Kininsystems auf diesem Wege müßte sich wenn sie inhibiert wird auf unser Schockmodell auswirken. Es zeigte sich daß die gewonnenen Daten im wesentlichen denen der Kontrollgruppe gleichen. Dies legt den Schluß nahe, daß im Verbrührungsschock der Aktivierung des Kininsystems über den Hagemann-Faktor keine bedeutende Rolle zukommt.

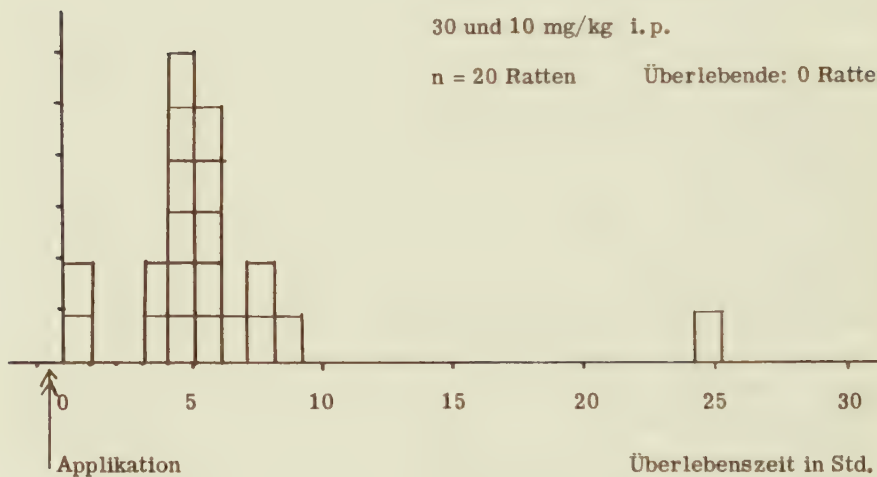
7. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

MORTALITÄT NACH X STD.

HEXADIMETHRINBROMID

30 und 10 mg/kg i.p.

n = 20 Ratten Überlebende: 0 Ratten

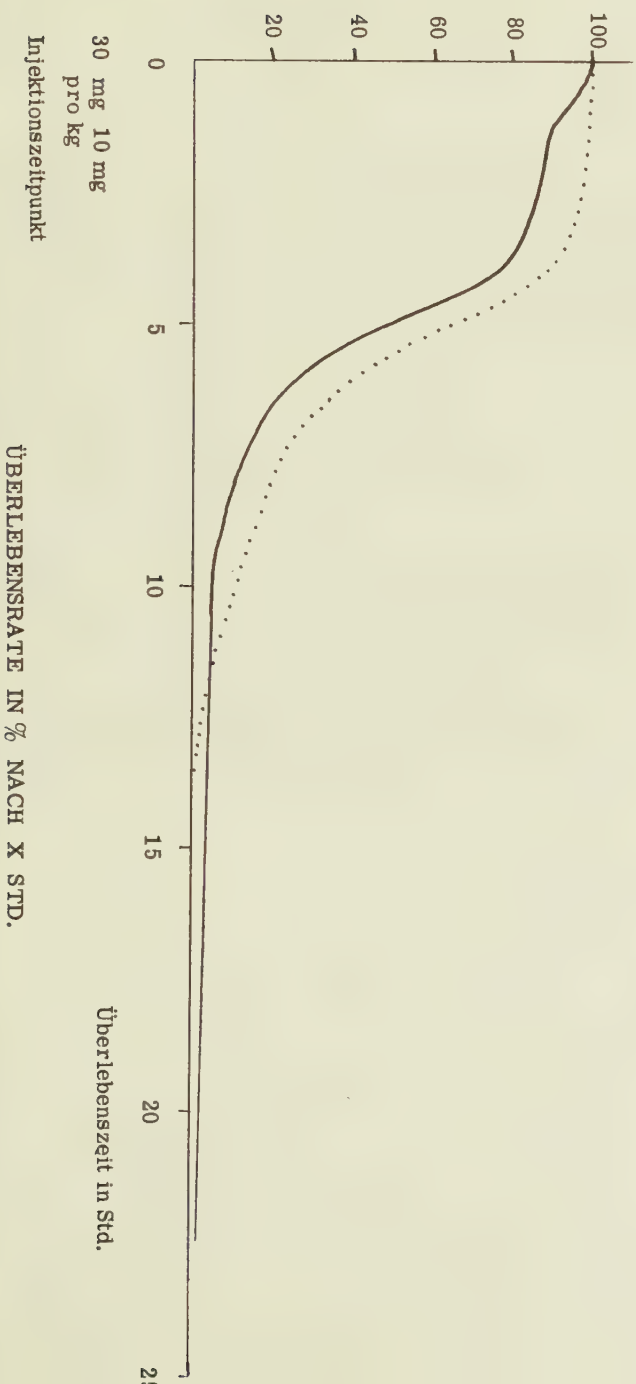


Überlebensrate in %

VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH: ———— HEXADIMETHYLBROMID $n = 20$ / Überlebende: 0 Rtt.

30 + 10 mg / kg l. p.

..... KONTROLLGRUPPE $n = 19$ / Überlebende: 0 Rtt.



ÜBERLEBENSRATE IN % NACH X STD.

4) Na - Thioglykolat

Wird Kallikrein mit Thioglykolsäure vorbehandelt, so wird die Kininfreisetzung aus Kininogen erhöht. Durch Thioglykolsäure wird die blutdrucksenkende Wirkung der Kinine potenziert. Darüber hinaus stellt die Thioglykolsäure einen starken Hemmstoff für das kininabbauende Enzymsystem des Serums dar (79). Nach Werle und Mitarbeiter (79,80) hemmt Thioglykolsäure den Kininabbau in vitro und in vivo.

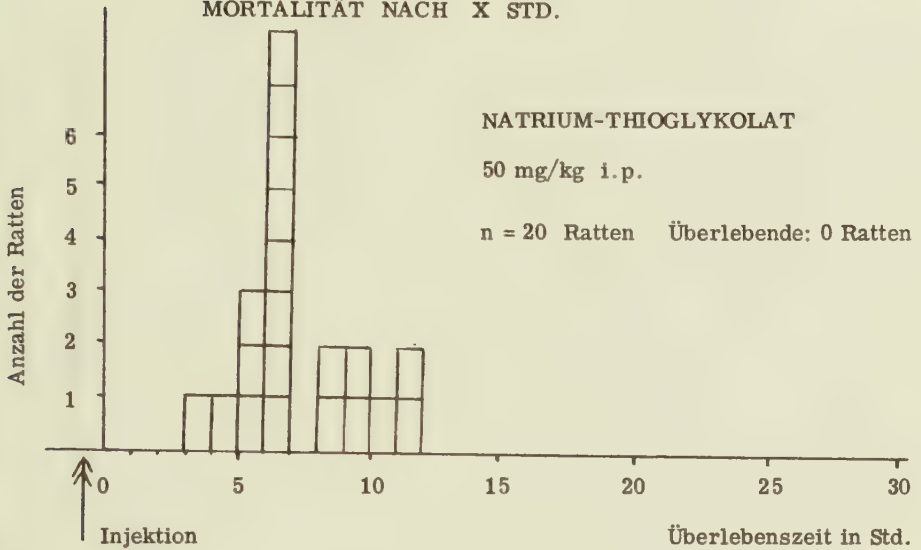
Auch die alleinige Zufuhr von Thioglykolsäure führt zu einer merklichen Blutdrucksenkung (80). Ob dies eine Eigenwirkung der Substanz oder Folge einer Fließ-Gleichgewichtsverschiebung von Kinin im Blut durch Hemmung des Kininabbaus ist konnte bisher nicht geklärt werden.

Wenn die Liberierung der Kinine eine wesentliche Ursache der letalen Wirkung der Verbrühung der Ratten darstellt, so sollte die Verabreichung von Thioglykolsäure die Überlebenszeit verkürzen. In der Tat war sie nach Gabe von 150 mg/kg signifikant verkürzt.

Auch dieses Ergebnis spricht für eine wesentliche Beteiligung des Kininsystems am pathophysiologischen Geschehen des Verbrühungsschocks. Allerdings dürfte hier auch eine eigene Toxizität der Thioglykolsäure eine Rolle spielen.

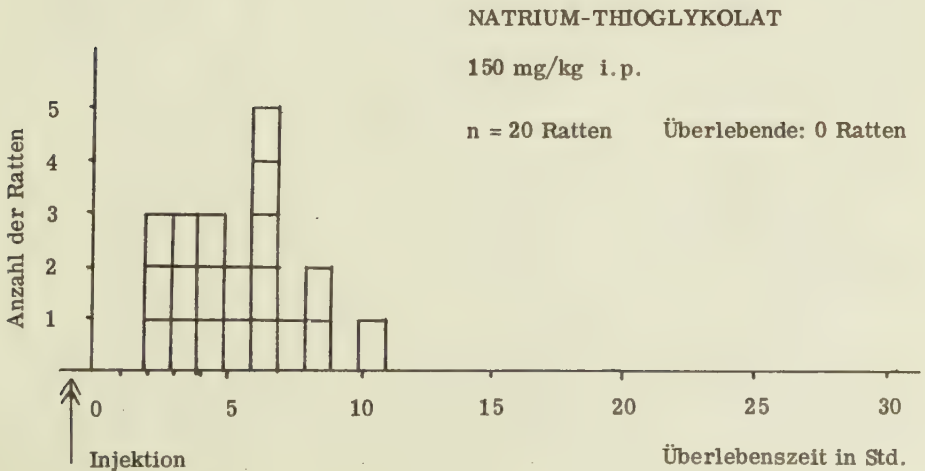
8. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

MORTALITÄT NACH X STD.



9. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

MORTALITÄT NACH X STD.



VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH:

NATRIUMTHIOGLYKOLAT

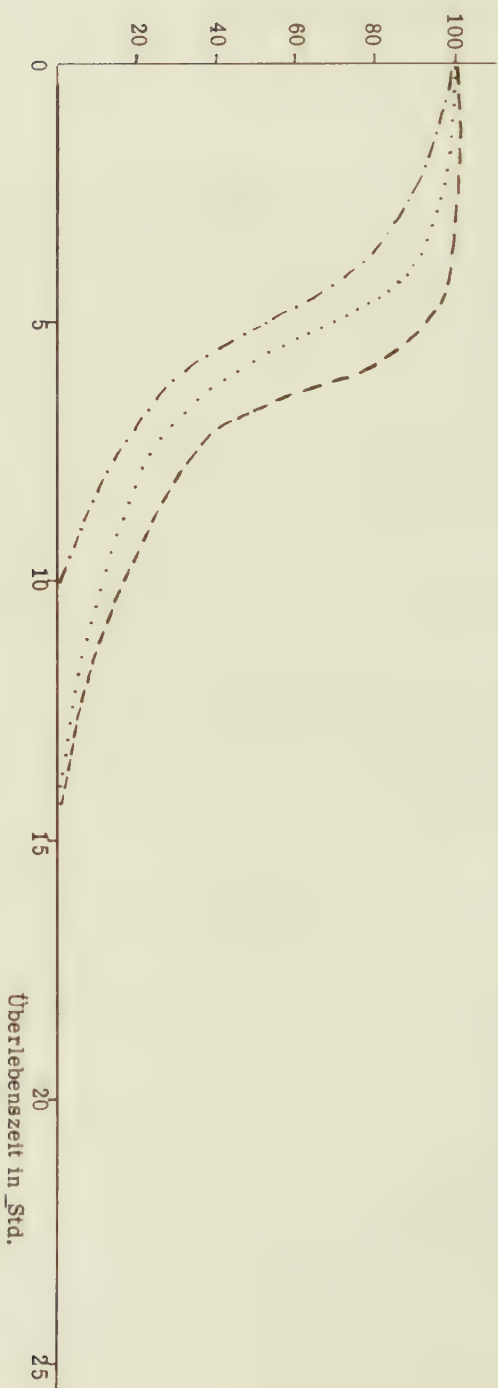
50 mg / kg l. p.

n = 20 / Überlebende: 0 Ratten

150 mg / kg l. p.

n = 20 / Überlebende: 0 Ratten

VERGLEICHSGRUPPE n = 20 / Überlebende: 0 Ratten

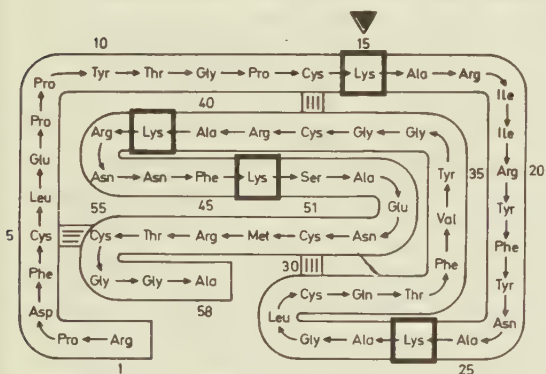


ÜBERLEBENSRATE IN % NACH X STD

5.) Der Proteinaseinhibitor T r a s y l o l ^R

In den bisher durchgeführten Versuchen griffen wir in der Regel an einer Stelle in das für das Zustandekommen des Kreislaufschocks verantwortliche Geschehen ein. Ausgehend von der Theorie der multifaktoriellen Auslösung des Schocks interessierte uns die Frage, ob bei Anwendung eines Inhibitors der an verschiedenen Stellen in dieses Geschehen eingreift, sich Veränderungen in den von uns beobachteten Parametern zeigen würden. Der Proteinaseinhibitor T r a s y l o l ist für in diesem Sinne durchgeführte Versuche dank seiner nachgewiesenen Eigenschaften geeignet. Trasylool ist der Kallikrein^R-Inaktivator, der von K r a u t, F r e y und W e r l e 1930 in Rinderorganen aufgefunden wurde. Frey und Kraut hatten 1926 erstmals einen Inhibitor im Blut entdeckt. 1953 wurde der Kallikrein-Inaktivator von E.K.Frey zum ersten Male klinisch bei akuter

Pankreatitis angewandt. Trasylool (chemische Kurzbezeichnung: Aprotinin) wird aus Rinderlunge gewonnen. Es ist ein basisches Ploypeptid mit einem Molekulargewicht von 6512. Es enthält 16 verschiedene Aminosäuren in einer Kette, die insgesamt aus 58 Aminosäureresten besteht. Die Stabilität des Moleküls beruht

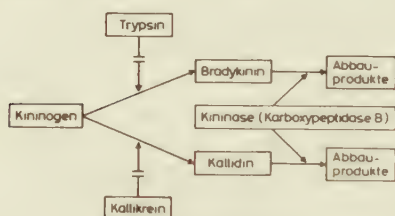


2. Aminosäuresequenz und S-S-Brücken des polyvalenten Protease-Inhibitors (Trasylool) aus der Rinderpankreas bzw. Rinderlunge. [Nach M. Laskowski (Lit. in 4) und F. A. Anderer (13)] auf den drei Disulfidbrücken

welche die 6 Cysteinglieder verknüpfen. Das aktive Zentrum liegt in der Lysin(15)-Alanin(16)-Sequenz. Bei unseren Versuchen benutzten wir die von der Fa. Beyer vertriebenen Trasylool-Ampullen zu 10 ml = 100 000 KIE. Die Ampullenlösung enthält pro ml 10 000 KIE Trasylool in steriler isotonischer Natriumchloridlösung. 1KIE (Kallikrein-Inaktivator-Einheit) ist diejenige Menge Proteinaseinhibitor, die unter optimalen Bedingungen 2 Kallikrein-Einheiten zur Hälfte zu inhibieren vermag.

Trasylool ist ein Proteinase-Inhibitor. Die durch Trasylool hemmbaren Proteinase haben eine proteolytische und eine esterolytische Wirkung. Zur Gruppe dieser Esteroproteinase gehören die Kininogenasen, Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Plasminaktivator

Plasmafaktoren in der Gerinnungsvorphase, Gewebs- und leukozytäre Proteinasen. Die Hemmung der Enzymaktivität kommt dadurch zustande, daß sich der Hemmbezirk des Inhibitor-Moleküls an das aktive Zentrum des jeweiligen Enzyms anlagert: es bildet sich ein inaktiver Enzym-Inhibitor-Komplex im Verhältnis 1:1. Die Enzym-Inhibitor-Bindung ist reversibel. Die Hemmung der Kininogenasen kann im biologischen Test anhand der verminderten Wirksamkeit auf den Blutdruck sowie anhand einer Hemmung der Spaltung synthetischer Aminosäureester, z.B. Benzoylarginin-äthylester (BAEE), ermittelt werden. Die antifibrinolytische Wirksamkeit des Trasylol beruht neben einer Hemmung der Akti-



II = Hemmung durch Trasylol

Abb. 3. Hemmung der Kininfreisetzung durch Trasylol

vierung des Plasminogens vor allem auf einer Inhibition des proteolytisch aktiven Plasmins. Wegen seiner direkten und intensiven Plasminhemmung bewahrt Trasylol nicht nur das unmittelbare Substrat des Plasmins, das Fibrin, vor der Lyse sondern auch weitere Substrate wie Fibrinogen, die Gerinnungsfaktoren V und VIII sowie α_2 -Globu-

line des Serums. Trasylol hat eine Hemmwirkung in der Vorphase der Gerinnung. Trasylol ist jedoch kein Antithrombin; die Endstufe der Gerinnung, d.h. die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin durch Thrombin, bleibt unbeeinflusst. Neben den im Blut vorhandenen Enzymen des Kininsystems, des Gerinnungssystems und des Fibrinolyse systems inhibiert Trasylol lysosomale Enzyme und weitere Proteinase, die beim Gewebeabbau freigesetzt und aktiviert werden. Trasylol hemmt Proteinase, die in ischämisch-hypoxisch geschädigten Geweben (z.B. im Schock oder durch Tourniquet) aktiviert werden. Es verhindert dadurch die Bildung und Freisetzung toxischer Polypeptide, u.a. Myocardial Depressant Faktor (MDF) und Pulmonary Lesion Factor.

Laut Angaben der Fa. Bayer beträgt die LD_{50} von Trasylol für Ratten 2,5 Mill. KIE/kg. Auch nach einer Dosierung von 300 000 KIE/kg Trasylol i.p. 7 mal wöchentlich über einen Zeitraum von 13 Wochen ließen sich histologisch keine irreversiblen Schädigungen bei den Tieren nachweisen. Dies ist insofern von Interesse als es uns deshalb gerechtfertigt erschien bei einzelnen Versuchen mit Dosierungen zu arbeiten, die zum Teil erheblich über den in der Literatur beschriebenen lagen.

Auf Grund neuerer Untersuchungsergebnisse nimmt man an, daß für den Irreversibilitätsmechanismus des Schocks mehrere Faktoren verantwortlich sind. Anteilsmäßig scheinen hierbei die bei der Gewebszerstörung aus den Lysosomen freigesetzten Proteasen eine zentrale Rolle zu spielen. M a s s i o n und E r d ö s konnten mit Proteaseninhibitoren das Irreversibelwerden des Endotoxinschocks verhindern (81). Laut Erdös kommt die vasoaktive Wirkung z.T. auch über eine Aktivierung der

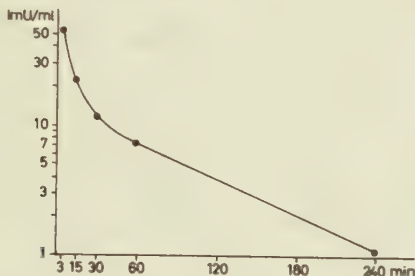


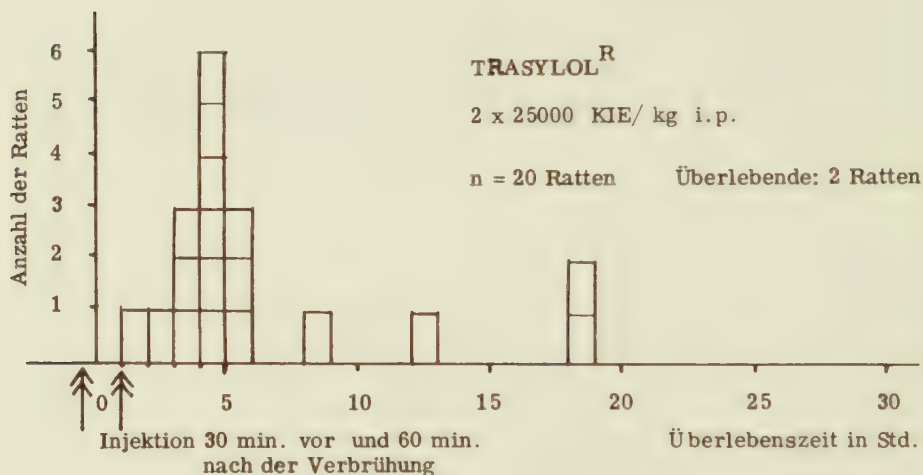
Abb. 6. Trasylol-BIutspiegelkurve nach Injektion von 18000 KIE/kg Körpergewicht bei Ratten. Ordinate: ImU/ml Serum (1 ImU entspricht 1,8 KIE); Abszisse: Zeitpunkt nach Injektion. Nach F. H. Dost (18) berechnete Eliminationshalbwertszeit: etwa 70 min.

Kinine zustande (82). In zahlreichen Arbeiten wurde nachgewiesen, daß beim Kreislaufchock im Plasma ein Aktivitätsanstieg lysosomaler Proteasen nachzuweisen ist (83,84). Dieser Aktivitätsanstieg ist eng mit dem Auftreten im Plasma eines "myocardial depressant factor (MDF)" verbunden; ein weiterer Weg zur Potenzierung des Schocks (85). H a b e r l a n d , B e r t e l l i , N. B a c k und W i l k e n s , S t o c k und E i g l e r konnten nachweisen, daß in verschiedenen Schockmodellen der Proteinaseninhibitor Trasylol schützend wirkt (86,87,88). In Bezug auf die Dosierung und den Applikationszeitpunkt stellte sich beim Vergleich der in der Literatur angegebenen Daten heraus, daß auf die Aufrechterhaltung eines wirksamen Plasmaspiegels zu achten war. Bei der Ratte schien Trasylol seine Hemmwirkung optimal zu erfüllen, wenn es in einer Dosierung von 20 000 KIE/kg i.p. und unmittelbar vor dem Trauma verabreicht wurde (89).

Im ersten Versuch verabreichten wir den Tieren 30 Min. vor und 60 Min. nach der Verbrühung je 25 000 KIE/kg Trasylol^R i.p. Im Vergleich zu den allein mit Ringerlösung behandelten Tieren konnte die Mortalität von 100 auf 90 % gesenkt werden; auch die Überlebenszeit war leicht verbessert worden.

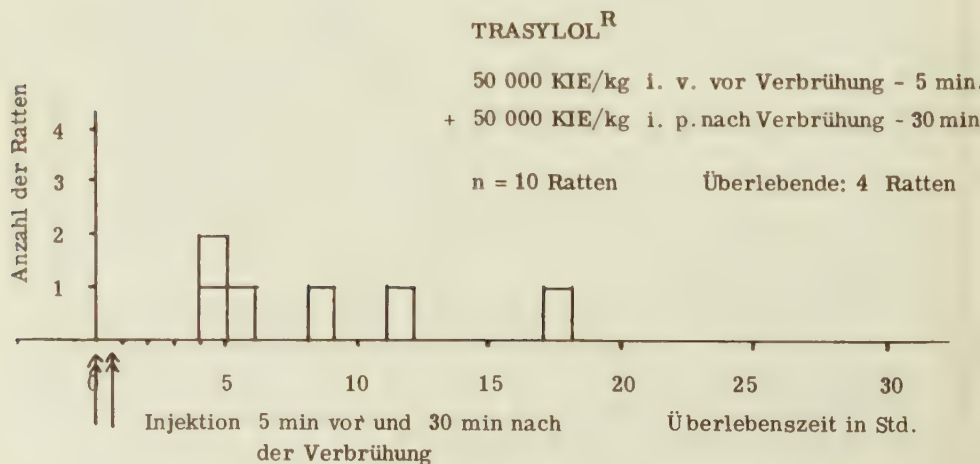
10. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

MORTALITÄT NACH X STD.



11. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

MORTALITÄT NACH X STD.



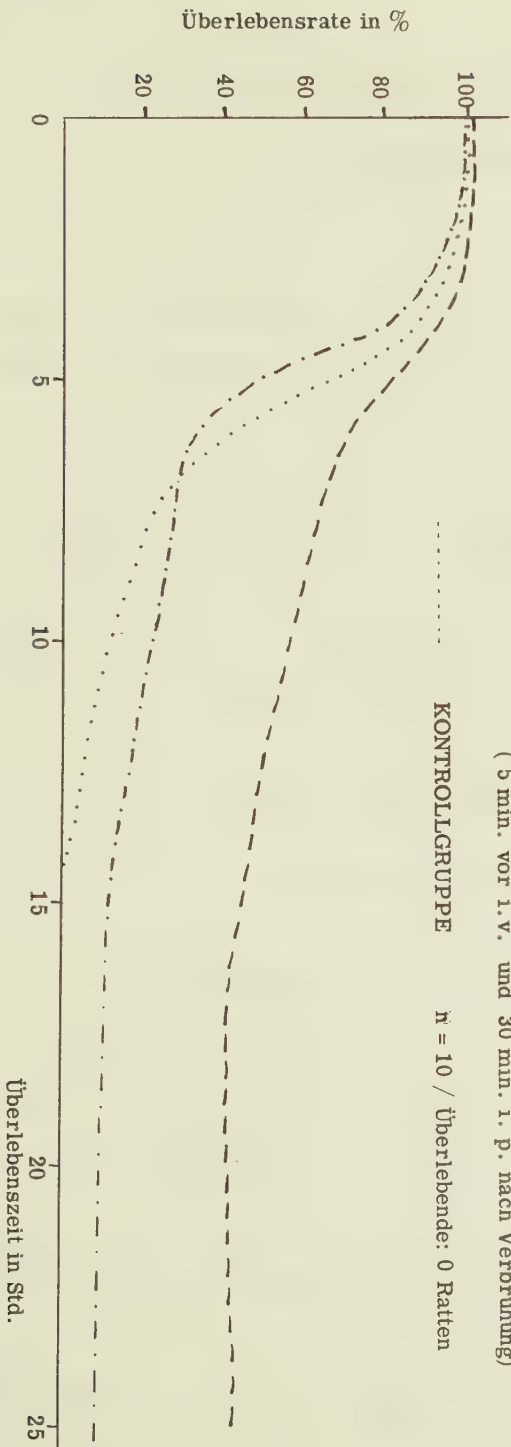
VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH:

T R A S Y L O L

2 x 25 000 KIE / kg i. p. n = 20 / Überlebende: 2 Ratten
(30 min. vor und 60 min. nach Verbrüfung)

2 x 50 000 KIE / kg n = 10 / Überlebende: 4 Ratten
(5 min. vor i. v. und 30 min. i. p. nach Verbrüfung)

KONTROLLGRUPPE n = 10 / Überlebende: 0 Ratten



ÜBERLEBENSRATE IN % NACH X STD.

Überlebenszeit in Std.

12. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

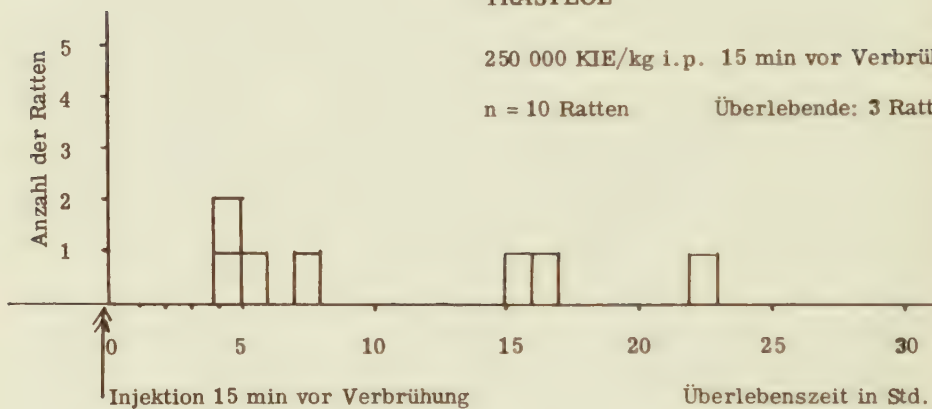
MORTALITÄT NACH X STD.

TRASYLOL^R

250 000 KIE/kg i.p. 15 min vor Verbrühung

n = 10 Ratten

Überlebende: 3 Ratten



13. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

MORTALITÄT NACH X STD.

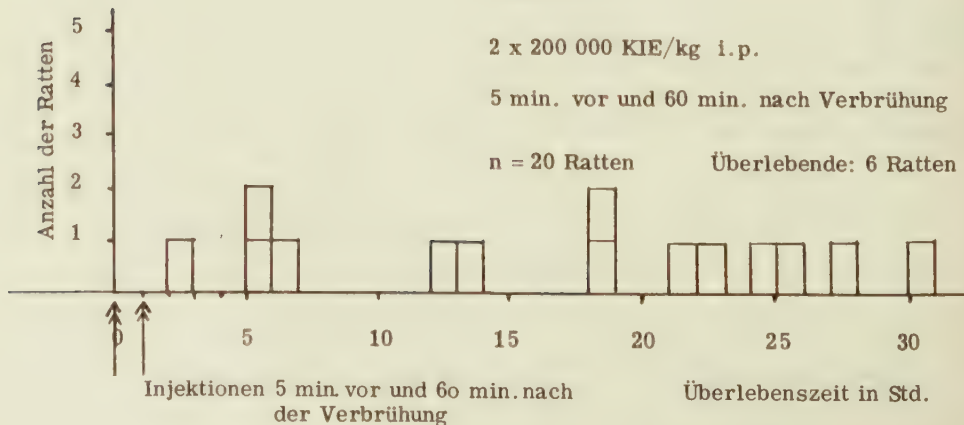
TRASYLOL^R

2 x 200 000 KIE/kg i.p.

5 min. vor und 60 min. nach Verbrühung

n = 20 Ratten

Überlebende: 6 Ratten



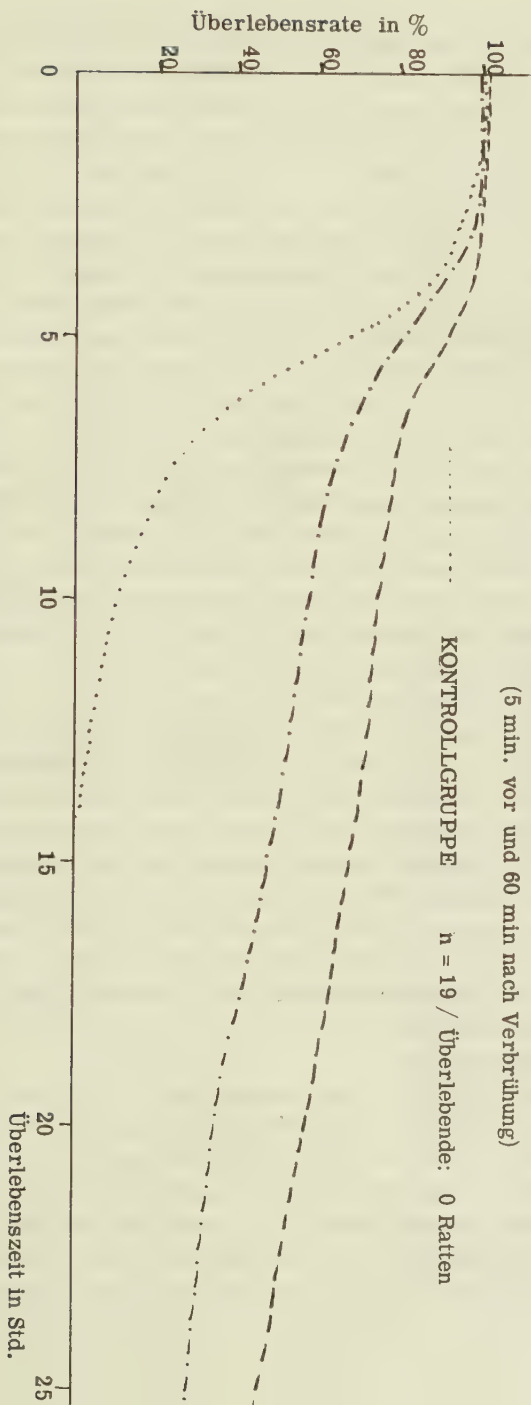
VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH:

T R A S Y L O L

250 000 KIE / kg i. p. n = 10 / Überlebende: 3 Ratten
(15 min. vor Verbrüfung)

2 x 200 000 KIE / kg i. p. n = 20 / Überlebende: 6 Ratten
(5 min. vor und 60 min nach Verbrüfung)

KONTROLLGRUPPE n = 19 / Überlebende: 0 Ratten



ÜBERLEBENSRATE IN % NACH X STD.

Überlebenszeit in Std.

Im zweiten Versuch steigerten wir die Dosis auf 50 000 KIE/kg die nun 5 Min. vor und 30 Min nach der Verbrühung erfolgten. Um sicher zu sein, daß der Plasmaspiegel des Trasylols ausreichend hoch war zur Zeit der Verbrühung erfolgte die erste Injektion i.v. in eine Schwanzvene, die zweite wie üblich i.p. Hier zeigte sich eine deutliche Verlängerung der Überlebenszeit, die auch mit einer Senkung der Mortalität auf nur noch 60 % einherging. Dieses Ergebnis weist auf die ausschlaggebende Bedeutung eines genügend hohen Plasmaspiegels des Proteinaseinhibitors hin. In unseren weiteren Versuchen steigerten wir die Menge des verabreichten Proteinaseinhibitors. Die Applikation von einmal 250 000 KIE/kg Trasylol i.p. deckte sich in ihren Ergebnissen mit denen die erzielt wurden durch 50 000 KIE/kg (i.v. und i.p.). Allerdings konnte die Mortalität diesmal nur noch auf 70 % gesenkt werden. Die Erklärung dafür, wieso mit einer derart massiven Dosis keine Verbesserung gegenüber der vorausgehenden Versuchsreihe erzielt worden war ist wohl darin zu sehen, daß in der Zeit die der Rattenorganismus für die Resorption benötigte, die durch das Trauma freigesetzten Proteasen ungehindert ihre Wirkung entfalten konnten. Nichtsdestoweniger sind die mit dieser massiven Dosis erzielten Ergebnisse im Vergleich zur Kontrollgruppe bemerkenswert. Dies um so mehr als bis jetzt in der Literatur nichts Positives über Versuche mit derart hohen Dosen zu finden ist. Die Tiere, die das Trauma überlebt haben wurden tagelang beobachtet wobei keinerlei Anzeichen einer eventuell später sich manifestierenden Schädigung festgestellt werden konnten. Durch dieses positive Ergebnis ermutigt gaben wir in der nächsten Versuchsreihe den Tieren zwei mal 200 000 KIE/kg Trasylol^R i.p. Gegenüber dem zuletzt zitierten Versuch fällt vor allem die Verlängerung der Überlebenszeit auf; die Mortalität sinkt auch hier auf 70 %. Auch diese Versuchsreihe bestätigt, daß die bis jetzt geübte Zurückhaltung in der Menge des applizierten Trasylols ungerechtfertigt ist. Ferner interessierte uns ob die Kombination des Proteinaseinhibitors Trasylol mit dem SBTI eine Steigerung gegenüber dem allein applizierten Trasylol oder auch SBTI bringen würde. Wir kombinierten beide Substanzen in den Dosierungen mit denen wir die besten Erfahrungen gemacht haben, d.h. zwei mal 200 000 KIE/kg Trasylol und 125 mg/kg SBTI. Die Testsubstanzen wurden den Tieren 5 Min. vor und 60 Min. nach der Verbrühung verabreicht.

14. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

MORTALITÄT NACH X STD.

KOMBINATION VON

TRASYLOL^R 2 x 200 000 KIE/kg i.p.

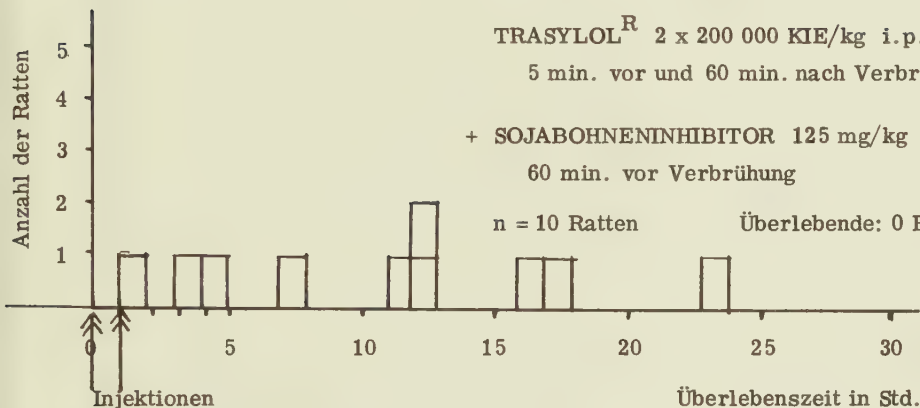
5 min. vor und 60 min. nach Verbrühung

+ SOJABOHNENINHIBITOR 125 mg/kg i.p.

60 min. vor Verbrühung

n = 10 Ratten

Überlebende: 0 Ratten



15. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

MORTALITÄT
NACH X STD.

KOMBINATION VON

TRASYLOL^R 2 x 200 000 KIE/kg i. p.

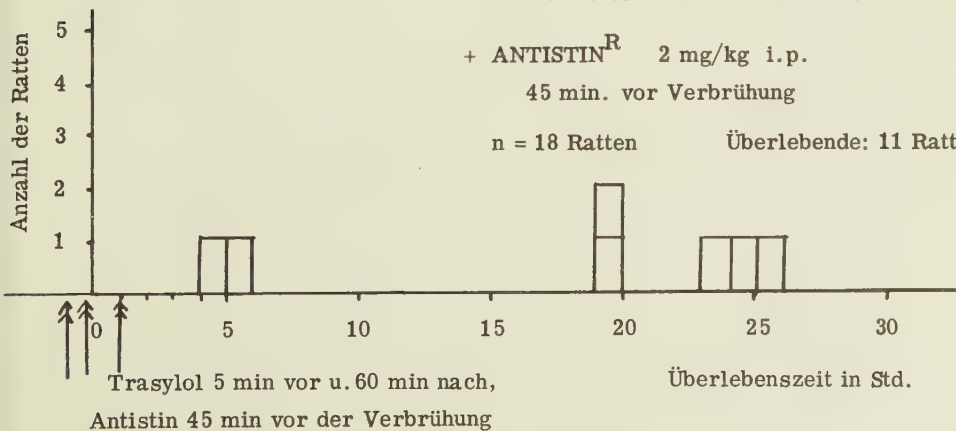
5 min. vor und 60 min. nach Verbrühung

+ ANTISTIN^R 2 mg/kg i.p.

45 min. vor Verbrühung

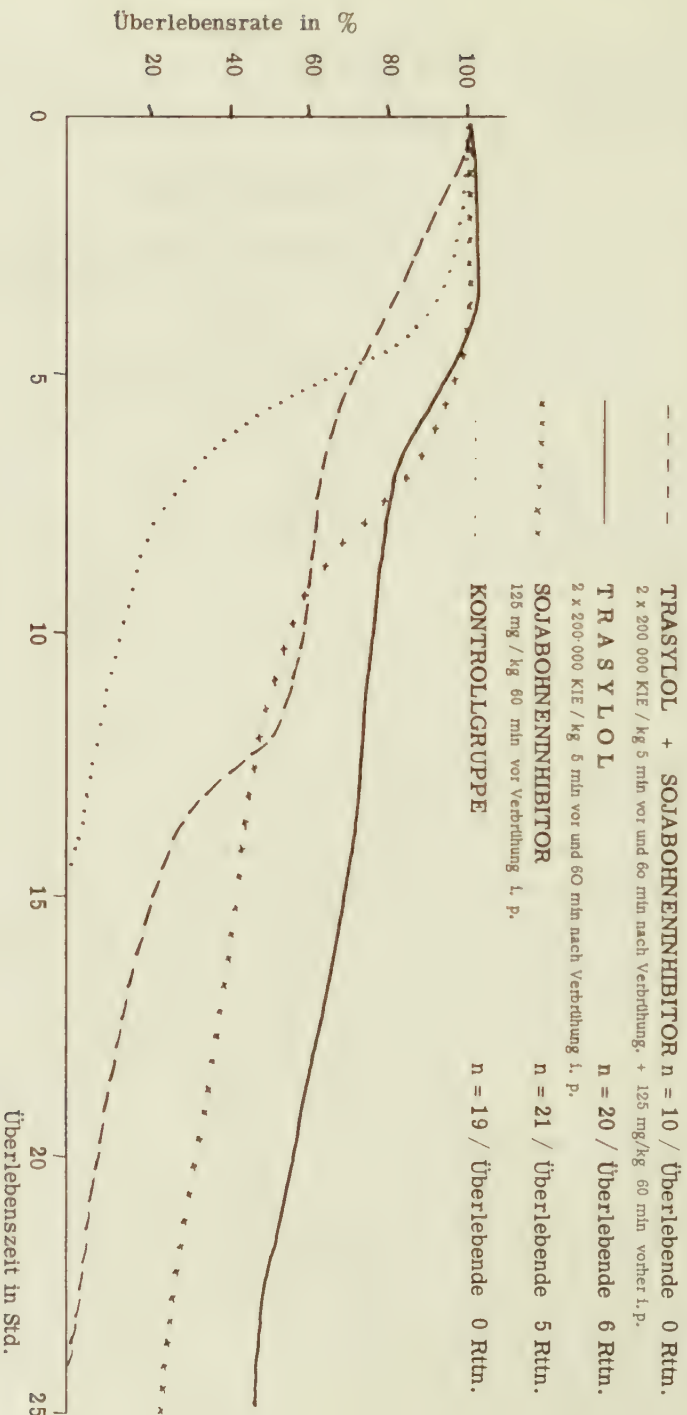
n = 18 Ratten

Überlebende: 11 Ratten



VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH:

KOMBINATIONSVERSUCH

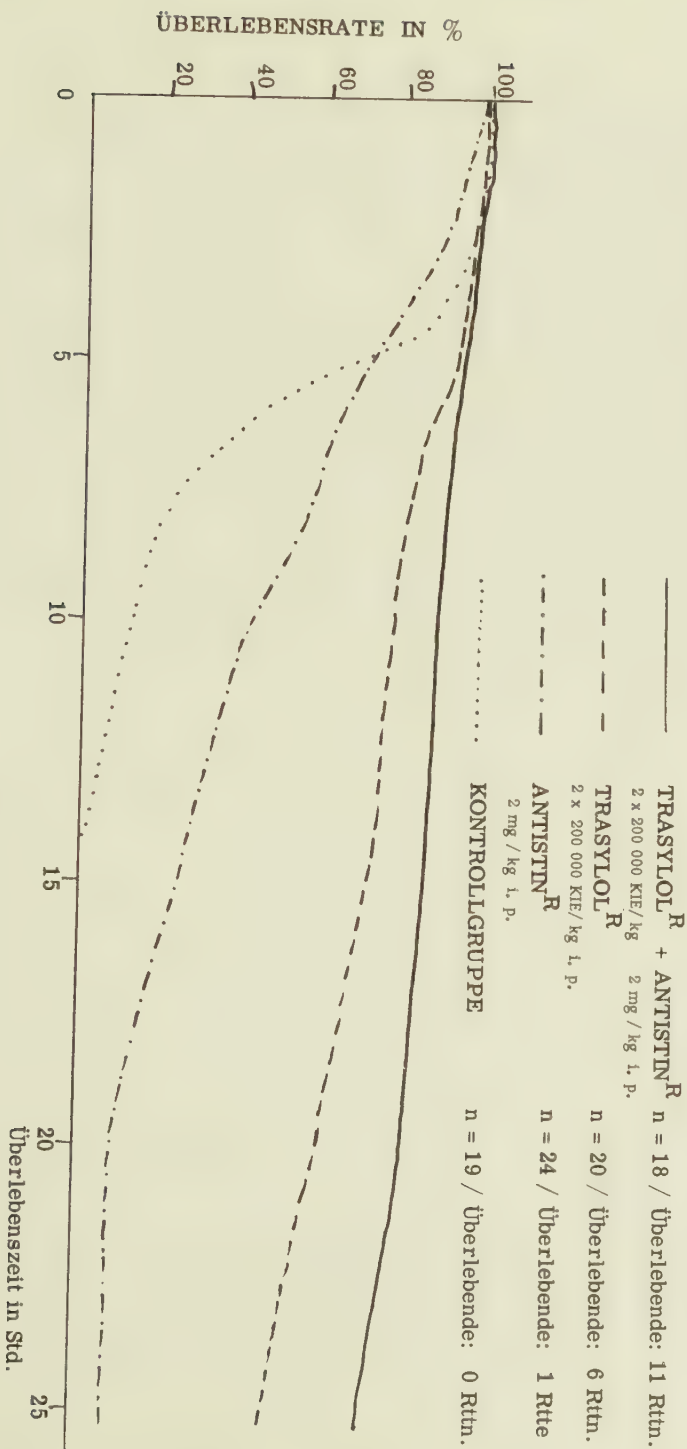


ÜBERLEBENSRATE IN % NACH X Std.

Überlebenszeit in Std.

VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCHE:

KOMBINATIONSVERSUCHE



ÜBERLEBENSRATE IN % NACH X STD.

Überlebenszeit in Std.

Mit der Kombination beider Substanzen konnte kein besseres Ergebnis erzielt werden als mit der jeweiligen alleine. In einem weiteren Versuch kombinierten wir das Trasylol mit dem Antihistaminikum A n t i s t i n. Im Gegensatz zum vorigen Versuch gelang es uns mit dieser Kombination die Effekte beider Teilsubstanzen zu summieren. Dies nicht nur in Bezug auf die Überlebenszeit sondern auch auf die Mortalität, welche auf 40 % gedrückt werden konnte! Hervorzuheben wäre, daß wir mit dieser Kombination die besten Ergebnisse erzielen konnten. In diesem Zusammenhang erscheint die Beobachtung von Kr. Heihel von Interesse wonach die rasche i.v. Injektion von 25 000 KIE Trasylol bei Ratten zu einem Kollaps führt. Es ist daher anzunehmen, daß die Wirkung der Antihistaminierung eine möglicherweise schädliche Wirkung von Histamin, das zusätzlich bei der Verabreichung sehr hoher Trasylolgaben frei wird kupiert. Andererseits besitzen Antihistaminika nach Lorenz und Werle auch eine z.T. bemerkenswert hohe Antikininwirkung.

D. Zusammenfassung und abschließende Diskussion.

=====

Ziel unserer Arbeit war es, Hinweise für die Beteiligung der Kinine und biogener Amine an den pathophysiologischen Prozessen zu finden, die zur Entwicklung des Schocks führen. Die Untersuchungen wurden durch eine aus mehreren Personen bestehende Arbeitsgruppe durchgeführt. Der Fragenkomplex wurde in verschiedene Teilaspekte zerlegt und von den jeweils beteiligten Personen selbstständig bearbeitet. Alle Untersuchungen wurden an demselben Modell durchgeführt. Ein umfassender Überblick ergibt sich aus den getrennten Darstellungen der an dem Projekt beteiligten. Dies gilt insbesondere für die Bedeutung der Prostaglandine und des Gerinnungssystems an den Folgen der Verbrühung.

Die vasoaktive Wirkung der Kinine ist schon seit 1937 bekannt. Im Laufe der Jahre vertieften die sich über diese Substanz gewonnenen Erkenntnisse; der Weg ihrer Aktivierung, die chemische Struktur und die pharmakologischen Wirkungen wurden näher untersucht. Lewis konnte wie erwähnt feststellen, daß die Kinine alle Zeichen der Entzündung hervorrufen können und ihrer vasoaktiven Wirksamkeit führte zu der Frage ihrer Beteiligung an der Pathogenese des Schocks.

Diese Arbeit befaßt sich in erster Linie mit den pathogenetischen Mechanismen, die bei Verbrühung zur Entwicklung eines Schocks mit allen seinen Folgen führen. Insbesondere die Frage interessierte uns, wie aus dem lokalen Trauma ein den ganzen Organismus beeinträchtigendes Geschehen wird. Der Schock selber wird allgemein definiert als ein Zustand beeinträchtigter Kreislaufverhältnisse mit ungenügender Gewebsperfusion und einem Mißverhältnis zwischen dem Sauerstoffbedarf des Gewebes und der am Ort vorhandenen Sauerstoffmenge. (29,30). Die konsequente Anwendung der Volumensubstitution in der Therapie des Schocks brachte gegenüber früher eine wesentliche Verbesserung der Überlebenschancen, doch blieben die Ergebnisse im wesentlichen unbefriedigend (46). Man erkannte, daß der Schock ein multifaktorielles Geschehen ist, in welchem die Systeme der Blutgerinnung, der Fibrinolyse, der Kreislaufregulation, des Stoffwechsels miteinander in mannigfaltigen Verbindungen stehen und sich so gegenseitig beeinflussen. Man erkannte, daß es nicht

genügen kann dem pathogenetischen Geschehen reaktiv z.B. bloß mit einer Volumensubstitutionstherapie zu folgen. Es kommt darauf an die Mechanismen zu erkennen, die zur Entwicklung des Schocks führen um bereits frühzeitig seine Entstehung zu verhindern. In dieser Arbeit wurde versucht die Rolle einiger Komponenten dieses Geschehens besser zu verstehen. In diesem Zusammenhang ist von kardinaler Bedeutung wie sich aus dem durch das thermische Trauma verursachten lokalen Schädigung ein generalisiertes Geschehen entwickelt. Werden lokal sog. Schockmediatoren frei, z.B. über freigesetzte Gewebsproteasen?

Die Beteiligung des Kininsystems an physiologischen und pathologischen Veränderungen kann man anhand des Kininogenspiegels messen. Seine Veränderungen werden als Hinweis für einen gesteigerten Verbrauch des Kallikreinsubstrates und eine vermehrte Kininfreisetzung gedeutet. Zach und Werle wiesen nach, daß Gewebsschädigungen aller Art zu einer Vermehrung des Kallikreinsubstrates im Plasma führen. Präkallikringehalt und Kininaseaktivität bleiben unverändert (50). Von verschiedenen Autoren konnte mit spezifischen Inhibitoren das bei Entzündungen entstehende Ödem unterdrückt oder abgeschwächt werden (51,52,54). Heute nimmt man an, daß die aus dem bei Verbrennungen zerfallenden Gewebe freigesetzten Proteasen die im Plasma befindlichen Kininogene aktivieren können und auch die Freisetzung biogener Amine z.B. aus den Mastzellen fördern. Solange die freierwerdenden und im Kreislauf erscheinenden proteolytischen Enzyme gehemmt und inaktiviert werden können bleibt das Geschehen auf die lokale Wunde begrenzt. Erreicht diese Hydrolasenentfesselung einen zu großen Umfang so kommt es zur entymatischen Entgleisung und zur ubiquitären Schädigung aller Organsysteme.

In unseren Untersuchungen benutzten wir als Versuchstiere jungfräuliche Ratten, die 30 sec. lang nach einem standardisierten Verfahren einem Wasserbad von 93°C ausgesetzt gewesen waren. Alle so behandelten Tiere starben innerhalb der ersten sechs Stunden nach dem Trauma im Schock. Die so behandelten Versuchstiere bildeten die Kontrollgruppe. Ausgehend von der Überlegung, daß die Applikation spezifischer Inhibitoren nicht ohne Einfluß bleiben dürfte auf unsere Parameter Überlebenszeit und Überlebensrate, erhofften wir uns von diesen Untersuchungen eine Aufklärung der Frage welche Faktoren an der Pathogenese des Schocks

beteiligt sind und welchen Anteil sie daran haben.

Da die Kinine Polypeptide sind werden sie von der Carboxypeptidase B durch Abspaltung des C-terminalen Arginins abgebaut. Die uns interessierende Frage war inwieweit dieses Enzym den in-vivo Effekt des Kininsystems vermindern würde. Zahlreiche Experimente wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt mit zum Teil gegensätzlichen Ergebnissen (69, 70, 71). Laut Erdös korrelieren das Absinken des Enzymspiegels im Blut und die Wiederkehr des Bradykinineffektes so gut, daß man von einem spezifischen Effekt der Carboxypeptidase B auf die Kinine sprechen kann. Die i.p. Applikation von 200 U/kg Carb. B zeigte eine in unserem Sinne stark positive Wirkung. Es zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine hochsignifikante Herabsetzung der Mortalität von 100 auf 65 %. Auch die Verlängerung der Überlebenszeit war mit einem $p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe (durchgerechnet nach dem Student-t-Test) hochsignifikant.

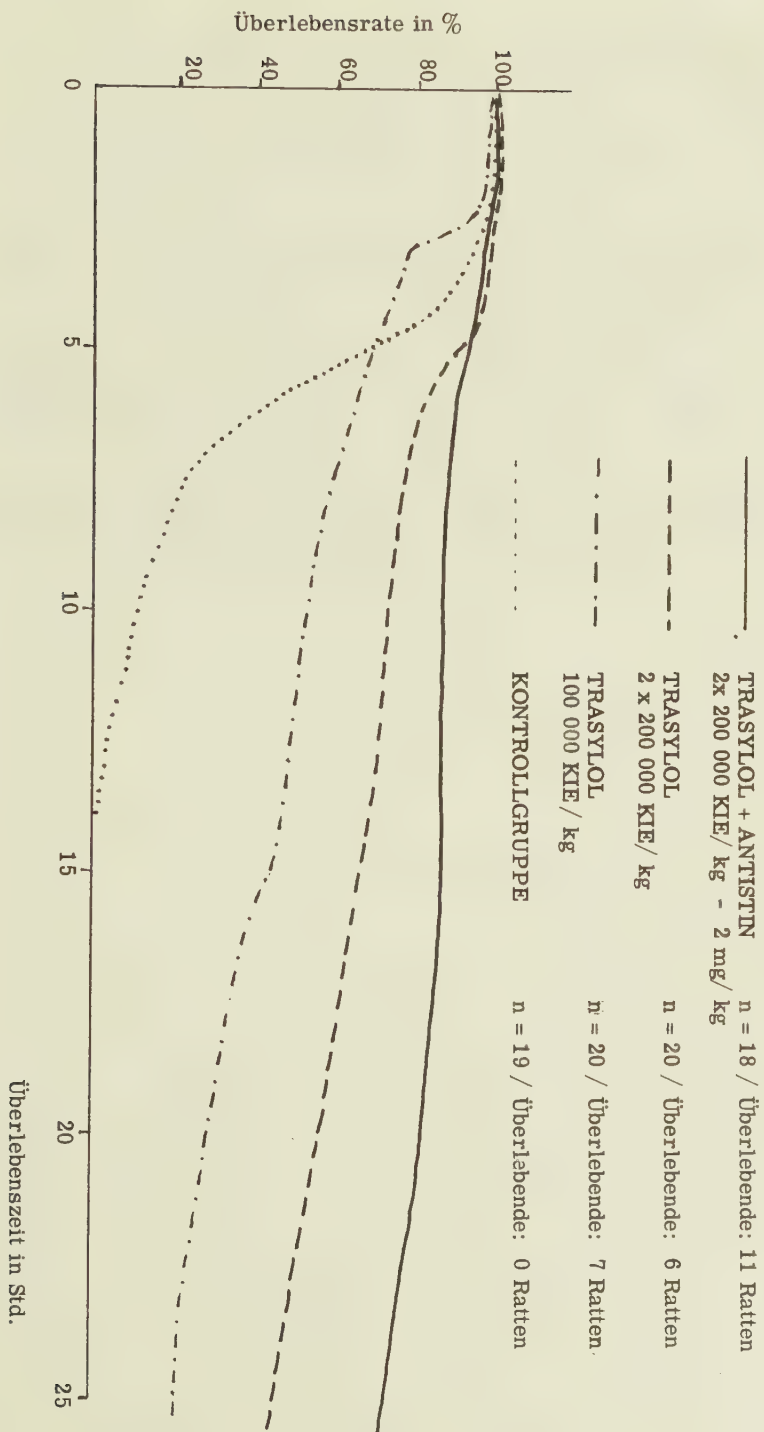
Vom Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (SBTI) ist bekannt, daß er das Kallikrein zu hemmen vermag. In vivo hemmt er die Ödementwicklung. In unseren Versuchen konnten wir mit 100 mg/kg SBTI die Mortalität der Versuchstiere auf 74 % senken. Auch die Überlebenszeit war hochsignifikant verlängert. Eine Kombination beider Mittel ergab zwar eine hohe Signifikanz gegenüber den nur mit Ringerlösung vorbehandelten Tieren, die Abweichungen von den Werten mit Carb.B und SBTI jeweils allein gegeben waren beim Kombinationsversuch statistisch nicht relevant. Eine Addierung der Effekte trat nicht ein. Angesichts der spezifischen Wirkung, die die Carb.B und SBTI auf das Kininsystem haben sprechen diese in vivo erzielten Ergebnisse für eine maßgebliche Rolle des Kininsystems beim Zustandekommen des Verbrühungsschocks. Die Permeabilitätsänderungen nach thermischen Traumen laufen in zwei Phasen ab, deren erste durch Antihistaminika verzögert werden kann. Daraus schloß man, daß die erste Phase durch Histamin verursacht wird (73,74). Mit dem Antihistaminikum Antistin in einer Dosis von 2 mg/kg konnten wir eine statistisch relevante Verlängerung der Überlebenszeit erreichen. Umgekehrt interessierte uns ob die Applikation einer Substanz die Ödeme erzeugt Auswirkungen auf die Versuchstiere haben würde. Als Testsubstanz wählten wir die Aminosäure 5-OH-Tryptophan, aus der im Organismus Serotonin entsteht. In unserem Experiment folgte der Verlauf der Überlebensrate in Abhängigkeit von der Zeit im Wesentlichen dem der Kontrollgruppe. Dies

läßt den Schluß zu, daß in unserem Schockmodell die Ödemauslösenden Faktoren ihre Wirkung bereits maximal entfaltet haben. Wie bereits betont ist der Verbrennungsschock ein multifaktorielles Geschehen. Die intravaskuläre Aktivierung des Kininsystems kann auch über eine Aktivierung des Hagemannfaktors zustande kommen (75). Der Hagemann-Faktor führt zur Kininbildung über eine Aktivierung des Präkallikreins (76). Da Hexadimethrinbromid die Aktivierung des Präkallikreins verhindert, konnten wir untersuchen ob im Verbrühungsschock der Aktivierung des Kininsystems über den Hagemannfaktor eine bedeutende Rolle zukommt. Die Versuchsergebnisse sprechen gegen diese Theorie. Die Aktivierung kann auch über das Komplementsystem zustande kommen. Na-Thioglykolat potenziert die blutdrucksenkende Wirkung der Kinine, weil es einen starken Hemmstoff für das kininabbauende Enzymsystem des Serums darstellt (79). Wie erwartet verringerte sich die Überlebensrate und die Überlebenszeit, da die Kinine ihre Wirkung länger entfalten konnten. Auch die Ergebnisse dieses Versuches sprechen für eine wesentliche Beteiligung des Kininsystems am pathophysiologischen Geschehen des Verbrühungsschocks.

Ausgehend von der Theorie der multifaktoriellen Genese des Schocks wollten wir wissen, ob die Anwendung eines Inhibitors der an verschiedenen Stellen in dieses Geschehen eingreift, sich Veränderungen in den von uns beobachteten Parametern zeigen würden. Der Proteinaseinhibitor Trasylol ist für in diesem Sinne durchgeführte Versuche dank seiner Eigenschaften geeignet. Der mit 25 000 KIE/kg Trasylol^R durchgeführte Versuch brachte eine leichte Verbesserung der Überlebenszeit und eine Senkung der Mortalität auf 90 %. Bereits im zweiten mit 50 000 KIE/kg 5 Min. vor i.v. und 30 Min. danach durchgeführten Versuch zeigte sich eine deutliche Verlängerung der Überlebenszeit, die auch mit einer Senkung der Mortalität auf nur noch 60% einherging. Dieses Ergebnis weist auf die ausschlaggebende Bedeutung eines genügend hohen Plasmaspiegels des Proteinaseinhibitors hin. In unseren weiteren Versuchen steigerten wir die Menge des verabreichten Proteinaseinhibitors. Die Applikation von einmal 250 000 KIE/kg Trasylol i.p. deckte sich in ihren Ergebnissen mit denen die erzielt wurden durch 50 000 KIE/kg Trasylol (i.v. und i.p.). Allerdings konnte die Mortalität diesmal nur noch auf 70 % gesenkt werden. Diese Daten weisen darauf hin, daß man um einen

VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCHE:

ZUSAMMENFASSUNG: TRASYLOL



ÜBERLEBENSRATE IN % NACH X STD.

therapeutischen Effekt zu erzielen mit relativ hohen Dosen arbeiten muß. Die Beobachtung der Tiere ließ keinerlei Anzeichen einer sich eventuell später manifestierenden Schädigung erkennen. In weiteren Versuchen kombinierten wir das Trasylol mit anderen schon vorher getesteten Substanzen. Lediglich die Kombination Trasylol plus Antistin brachte eine außergewöhnlich starke Addierung der Effekte. Dies nicht nur in Bezug auf die Überlebenszeit, sondern auch auf die Mortalität, welche bis auf 40 % gesenkt werden konnte.

Die oben zitierten Versuche weisen darauf hin, daß dem Kininsystem bei der Entwicklung und der Unterhaltung des Verbrühungsschocks eine maßgebliche Rolle zukommt. Sie bestätigen ferner, daß auch andere Faktoren beteiligt sind. Die in dieser Arbeit untersuchten scheinen lediglich eine untergeordnete Rolle zu spielen. Über die Bedeutung anderer Faktoren wie z.B. der Prostaglandine, des Gerinnungs- und des fibrinolytischen Systems wird in parallel laufenden Arbeiten referiert.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

= = = = =

1. Werle E. ; W. Götze; A. Keppler : Biochem.Z. 289,217 (1937)
2. Rocha e Silva,W.T. Beraldo,G.Rosenfeld : Am.J.Physiol. 156,261 (1949)
3. Boissonas R.A.,St. Guttman, P.A. Jaquenoud, H.Konzett u. E.Stürmer : Experimentia 16,326 (1960)
4. Nicolaides E.D.,H.A. de Wald, P.G. Shorby u. J. Collin Nature 187,773 (1960)
5. Frey E.K. Arch. klin. Chir. 142:663 (1926)
6. E.K. Frey,H.Kraut, R.Vogel, G.Zickgraf-Rückl, Trautschold Das Kallikrein-Kinin-System u. seine Inhibitoren Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1968 S.28
8. Webster M.E. : Arthritis Rheumatism. 9,473 (1966)
9. Werle E.W., Kehl,K.Koebke : Biochem.Z. 320.372 (1950)
10. Vogt W., G.Garbe u. G. Schmidt : Arch. exp. Path. Pharmacol. 256,127 (1967)
11. Werle E., W. Appel u. E.Happ Arch. exp. Path. Pharm.234,364 (1958)
12. Werle E., R. Marx, I. Trautschold u. K.E. Reichenbach-Klinke Blut 14,206 (1967)
13. Wu F.C.,M. Laskowski : J.biol.Chem. 235 , 1680 (1960)
14. Frey E.K., H.Kraut, E. Werle : Kallikrein (Padutin) F.Enke Stuttgart 1950
15. Trautschold F., H. Fritz u. E. Werle in : E.G. Erdös, N. Back, F. Sicuteri : Hypotensives Peptides
16. Lewis G.P. : Handbook of Exp. Pharmacology Bd.25, S.516 Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1970
17. Frey E.K., E.Werle, E. Sackers : Z.ges.exp.Med.96,404 (1935)
18. Saarneli K., T. Eskes : Fed.Proc. 21,400 (1962)
19. Beretta Anguissola, F.S. Feruglio, S.Campus, L. Chianducci G. Pandolfo u. G.But in : E.G.Erdös,N. Back, F.Sicuteri Hypotensive Peptides Springer, New York 1966 S. 430
20. Rocha e Silva : Nature 145,591 (1940)
21. King, Reynolds, Price : S. Forum 6 : 80 (1955)
22. Carr J., D.L. Wilhelm : Nature 208,653 (1965)
23. Palade G.E. Circulation 24 : 368-384 (1961)

24. Nakano J. u.T.Kusakari : Angiology 17, 333 (1965)
25. Werle E. Münchn. med. Wschr. 115 Nr.7 (1973)
26. Feldberg W.,G.P. Lewis : J.Physiol. 178,239 (1965)
27. Collier H.O. in : E.G. Erdös, N. Back u. F. Sicuteri : Hypotensive Peptides, Springer, New York 1966 S. 305
28. Arturson G. Acta chir. Scandinav. supp. 274:1 (1962)
29. Horn L. Ed. Reconstructive Plastic Surgery, Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1964 p. 2197
30. Lasch H.G. in : Neue Aspekte der Trasyllol-Therapie Bd.3 Schattauer Verlag, Stuttgart- New-York (1969)
31. Werle E. Ber. Ges. Inn. Med. 7 (1970)
32. Messmer K. : Münchn. med. Wschr. 112,357 (1970)
33. Truninger B. : Intrn. Symposium über Stoffwechselveränderungen im Svhook, Freiburg (Br.) 1969
34. Markgraf W. , W. Greuer, Th. Ahlborn u. R. Häuel : Langenbecks Arch. Chir. 326 , 106- 136 (1970)
35. Wieland O., Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 70, 548 (1964)
36. Sandritter W. Klin. Wschr. 51. 1-2 (1973)
37. Spector W.D. u. D.A. Willoughby : Bact. Rev. Vol. 27. 117-148
38. Lasch H.G. in : Neue Aspekte der Trasyllol-Therapie Bd.3 S. 31 - 36
39. Neuhof H. u. H.G. Lasch , Dtsch.med. Wschr. 95,1937 (1970)
40. Rocha e Silva M. : Biochem. Pharmacol. 10 , 3 (1962)
41. Rocha e Silva M. : Ann.N.Y. Acad.Sc. 104, 190 (1963)
42. Kaller H. in R. Gross und G. Kroneberg (Eds.) : Neue Aspekte der Trasyllol-Therapie, Schattauer, Stuttgart 1966 S. 152
43. Lewis G.P. : Ann. N.Y. Acad. Sc. 104, 236 (1963)
44. Zach H.P. und E. Werle : Res. exp. Med. 161,89-100 (1973)
45. N. Back, M. Jainchill, H. J.Wilkens , J.L. Ambrus Med. Pharmacol. exp. 15 : 597 - 602 (1966)
46. Cope, O., Moore : Ann. Surg 126,1010-1045 (1947)
47. Allgöwer M. ; J. Siegvist : Springer, Berlin 1957
48. W. Sandritter : Klin. Wschr. 51, 1 - 2 (1973)
49. Schumer W.; R. Sperling : J.Amer. med. Ass. 205 (1968) 215
50. H.P. Zach und E. Werle : Naunyn - Schmiedeberg-Arch.Pharm. 276 , 167 - 180 (1973)
51. Erdös E.G. ; Wohler J R. Lewinw E.J. J. Pharmacol Exp. Therap. 142 , 327 (1963)
52. Webster M.E.; Skinner N.S. Powell W.J. Amer. J. Physiol. 212,553 (1967)
53. EderyH.;Lewis G.P. J.Physiol.169, 568. (1963)
54. Jacobsen, B. Waaler B.A. Brit.J.Pharmacol. 27,222 (1966)

55. Arturson G. : Scand. J. chir. Lab. Invest. Suppl.
107,153-161, (1969)
56. Beraldo W.T. Am.J.Physiol. 163 : 283-289
57. Bazin S.;Delaunay A. Excerpta medica 1969 Amsterdam
58. Deduve C. New York, Ronald Press Co. 1959
59. Greuer W. Aulendorf: Editio Cantor 1962
60. Greenbaum, Yamafuji ; International Symposium on Vasoactive
Polypeptides Sao Paulo 1966
61. Spector u. Willoughby
J. Pathol. Bacteriol. 78 : 121 - 132 ; (1959)
62. W. Marggraf , W. Greuer, Th. Ahlborn, K. Häuel
Langenbecks Arch. Chir. 326,106-136 (1970)
63. Brooks J.W. , Evans E.J., Harm W.T. Reid J.D.
Am. Surg. 136 : 535 - 545 (1952)
64. Grisola A., Forrest W.F. Peltier: J.Trauma, 3 : 259 - 264 (1963)
65. Pears H.,Kingsley H.D. : Surg. Gynec. Obstet, 98 : 385 - 394(1954)
66. Rosenthal S.M. : Rep. Wash., 57 : 1923 -1925 (1942)
67. Schildt B. Nillson A., Europ. Surg. Res. 2 : 23 - 33 (1970)
68. Erdös E.G.; Sloane E.M. :Biochem.Pharmacol. 11:585 (1962)
69. Eigler F.W., Stock W. Med.Welt 22 Heft 29/30 (1971)
70. Erdös E.G. R.Wohler,Macy I.Levine
J.of Pharm. and Exper. Therapeutics: Vol. 142 No. 3 Dec.1963
71. Erdös,Renfrew, Sloane Ann.N.Y. Acad.Sc. 104 : 222 (1963)
72. Erdös E.G., Hsiu,Y.T.Yang:Ann.N.Y.Acad.Sc.Vol.146 361-787
73. Spector W.G.,D.A.Willoughby:Bact.Rev. Vol.27,117-154 (1963)
74. Wilhelm D.L.,Brenda Mason: Brit.Med.J. Nov.8, 1141-1143 (1958)
75. Margolis j.:J.Physiol.151,238-252 (1960)
76. Eisen V. : Brit.J.Pharmacol. 22,87-103 (1964)
77. Armstrong D.A.,Stewart : Nature 194 , 689 (1962)
78. Garcia Leme,Rocha e Silva:Br.J.Pharm. 40, 294-309 (1970)
79. Hochstraßer,Werle : Hoppe-Seylers Zeitschrift f. physiol.Chemie
336 , 135 (1964)
80. Werle E. , Hochstraßer,J.Trautschold, Leysath
Hoppe Seylers Zeitschr. f. physiol.Chemie Bd 337 ,286-288 (1964)
81. Massion W.H.,E.G.Erdös:J.Okla.med.Ass.59:467 (1966)
82. Erdös E.G.:Advanc.Pharmacol. 4 : 1 (1966)
83. JanoffA.,G.Weissmann,B.W.Zweifach:J.exp.Med. 116:451 (1962)
84. Sherry S. Fed. Proc. 20 : 209 (1961)
85. Baxter J.R. Mosely,Sleeman: Surg.Forum 17 : 1 (1966)
86. Back N.,H.Wilkins,R.Steger:Am.N.Y.Acad.Sc. 146 : 491 (1968)
87. Bertelli A.,J.Donati :Plenum Publish.Corp. New York (1970)
88. Stock W.,Eigler F.W. : Z.ges.exp.Med. 115 : 64 (1969)
89. Bützow G.W., J.Lindrer,J.Zaki : Neue Aspekte der Trasylol-
Therapie Bd.5 Schattauer-Verlag'- Stuttgart- New York

Lebenslauf

Am 11.9.1949 wurde ich als Sohn des Tischlers Waclaw Lewandowski und seiner Ehefrau Genowefa geb. Kuropatwa in Bad Reichenhall geboren.

Von 1955 bis 1959 besuchte ich die Volksschule in München. 1960 wechselte ich in das Nymphenburger Gymnasium in München über. Von 1963 bis 1968 besuchte ich das College Irlandais in Paris, an welchem ich auch das Abitur im Jahre 1968 bestand,

Von 1968 bis 1969 besuchte ich das Studienkolleg in München.

Im WS 1969/70 begann ich mit dem Medizinstudium in München. Das Staatsexamen gedenke ich im Herbst 1975 abzulegen.

